VISIT…

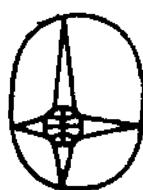
LANZAROTE
Caliente.COM

П. Ригетти

ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЕ ФОКУСИРОВАНИЕ

Теория, методы и применение

Перевод с английского
канд. биол. наук. Л. А. Остермана и
канд. хим. наук А. Л. Остермана



Москва «Мир» 1986

Isoelectric Focusing: Theory, Methodology and Applications

Pier Giorgio Righetti

Professor of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Science, University of Milano, Italy

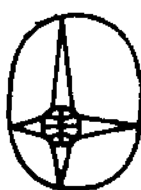
Elsevier Biomedical Press
Amsterdam · New York · Oxford

П. Ригетти

ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЕ ФОКУСИРОВАНИЕ

Теория, методы и применение

Перевод с английского
канд. биол. наук. Л. А. Остермана и
канд. хим. наук А. Л. Остермана



Москва «Мир» 1986

ББК 28.071
Р49
УДК 577.3

Ригетти П.

Р49 Изоэлектрическое фокусирование: Теория, методы и применение: Пер. с англ. — М.: Мир, 1986. — 398 с., ил.

Монография итальянского исследователя посвящена одному из самых эффективных современных методов разделения и анализа белков. Рассмотрены теория и принципы метода, его возможности и ограничения, дана характеристика амфолитов-носителей, колонок и аппаратуры, приведено подробное описание конкретных методов анализа и разделения белков методом изоэлектрофокусирования (ИЭФ), а также сочетания ИЭФ с ионообменными методами.

Для молекулярных биологов, биохимиков, иммунологов и биологов других специальностей, занимающихся разделением и очисткой белков.

$\text{Р}\ \frac{2001040000}{041(01)-86}$ **127—1986, ч. 1** **ББК 28.071**

Редакция литературы по биологии

© 1983, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam
© перевод на русский язык, «Мир», 1986

От переводчика

Читателям, использующим в своей работе изоэлектрофокусирование (ИЭФ), имя автора этой книги должно быть хорошо знакомо. П. Ригетти и его сотрудники разработали ряд оригинальных экспериментальных приемов, охватывающих всевозможные аспекты метода, — от синтеза амфолитов-носителей до регистрации сфокусированных зон. В настоящее время профессор Ригетти возглавляет исследовательскую группу, усилия которой направлены на решение таких актуальных методических проблем, как изоэлектрическое фракционирование пептидов, использование иммобилизованных градиентов pH и др.

Книга начинается кратким экскурсом в историю создания и развития ИЭФ. Далее автор формулирует основные положения теории метода, обсуждает природу и влияние факторов, вызывающих наблюдаемые экспериментально отклонения от идеальной равновесной модели ИЭФ. Значительное внимание уделено методам синтеза и сравнительному анализу характеристик различных типов амфолитов-носителей. Во второй главе рассмотрены многочисленные препаративные варианты ИЭФ, приведены принципиальные схемы соответствующих аппаратов и приспособлений. Рассмотрены новые методические подходы к фракционированию белков, такие как «амфолит-вытеснительная хроматография» и «хроматофокусирование», основанные на ионообменной хроматографии в сочетании с использованием амфолитов-носителей.

По-видимому, наибольший интерес для читателей представляет третья глава, содержащая подробный анализ проблем, связанных с аналитическим ИЭФ. Большое внимание уделено свойствам матриц и гелевых сред для ИЭФ, способам приготовления обычных и ультратонких гелей, методам регистрации зон, двумерным методам фракционирования белков. Рассмотренные в этой главе новые экспериментальные подходы (изо-

электрическое титрование, аффинное ИЭФ, крио-ИЭФ и другие) открывают возможности к использованию ИЭФ не только для решения традиционных аналитических задач (характеристика белкового состава препарата, выяснение гомогенности, определение изоточки и т. п.), но и в качестве весьма тонкого инструмента исследования структурно-функциональных особенностей индивидуальных белков.

Из материала, вошедшего в четвертую главу, особого внимания заслуживают разделы, посвященные электроэндосмотическим и другим артефактным явлениям, с которыми приходится сталкиваться при работе с ИЭФ. В пятой главе наряду с разбором конкретных примеров использования обычного ИЭФ кратко обсуждается новый метод — ИЭФ в иммобилизованном градиенте pH. В изложении материала всех пяти глав книги широко использованы и цитируются многочисленные публикации в периодической научной печати по 1982 г. включительно.

Встретившиеся нам в тексте отдельные неточности и типографские ошибки были исправлены при переводе. В целом настоящая книга является ценным практическим руководством для широкого круга экспериментаторов, специализирующихся в области биохимии, молекулярной биологии, генетики, медицины и других смежных областях науки.

Л. А. Остерман

Первое посвящение

Пока история создания метода еще не подернулась тусклой патиной беспощадного времени, пока процесс «размывания идейных истоков» еще не успел окончательно деформировать истинную цепь событий, я хочу посвятить эту книгу проф. X. Свенссону (Рильбе), проф. А. Колину и д-ру О. Вестербергу — «Троице» метода изоэлектрического фокусирования.

Второе посвящение

Адриане, Сабине и Монике — «Троице» моей жизни.

Предисловие

Считается, что предисловие должно быть весьма формальным и малоинформативным, ровно настолько, чтобы искушенный читатель мог, опустив со спокойным сердцем несколько первых страниц, обратиться прямо к тексту. Данное предисловие не очень-то укладывается в привычные рамки. Мне остается лишь надеяться, что оно не отвратит Вас от прочтения всей книги.

Почему именно мне выпало написать эту книгу? Почему мне, а не профессору X. Свенссону (Рильбе) или доктору О. Вестербергу — тем, кто несет основную долю ответственности за появление и развитие метода? Трудно ответить определенно; может быть, просто потому, что «так уж сложились обстоятельства»... В 1968 году, когда я работал в Массачусетском технологическом институте, мне довелось попасть на один семинар, где некий японский ученый делал сообщение об очистке тканевых ферритинов с помощью изоэлектрофокусирования. Семинар проходил на редкость спокойно — без вопросов и оживленных дискуссий. Все впервые слышали об этом методе, и никто, кажется, так и не понял, как он на самом деле работает. 1968 год оказался во многих отношениях революционным. Студенческие волнения, начавшиеся в Париже, прокатившиеся по всей Франции, а затем и по всей Западной Европе, столь основательно сотрясали академические и университетские своды, что революция в области методов разделения и ее восходящая звезда — метод изоэлектрофокусирования — оказались едва замеченными.

В этом предисловии мне хотелось бы упомянуть о некоторых событиях, предшествовавших рождению нового биохимического метода. Это будет краткий отчет, основанный на материалах небольшого «симпозиума» (октябрь, 1980), который состоялся в ресторане «Tre Travare» («Три скакуна»), что возле ипподрома Сольвалла в Стокгольме. В качестве докладчиков присутст-

вовали: Х. Свенссон (Рильбе), О. Вестерберг, Х. Хаглунд, Н. Дэвис, Б. Бьеллквист и К. Эк. Моя роль заключалась в ведении протокола.

Итак, в 1959 году Свенссон (который в 1968 году поменял фамилию на Рильбе) нанес визит Л. Полингу в Калифорнийский технологический институт. Он уже наметил основные положения теории изоэлектрофокусирования, однако был весьма разочарован тем, что даже в американских химических каталогах так и не смог отыскать подходящих амфолитов. По возвращении в Швецию Свенссон, работая в качестве «вольнонаемного» в Каролинском институте (заметим, что в те времена найти место в профессуре было ничуть не легче, чем сейчас), объединяется со студентом-медиком О. Вестербергом для решения практических аспектов проблемы. После трех лет медленного продвижения к цели Свенссону удается получить место профессора в Гетенбурге, и «экспериментальное объединение ИЭФ» распадается. Тем не менее Вестерберг в Стокгольме продолжает поиски решения проблемы и уже весной 1964 г. по телефону торжественно сообщает Свенссону о том, что ему удалось наконец разработать подходящий метод синтеза амфолитов-носителей. После тщательного изучения и проверки экспериментальных данных оба исследователя окончательно убеждаются, что решение найдено, и обращаются к фирме LKB Produkter с предложением наладить промышленный выпуск реактивов и оборудования для ИЭФ. В те времена Уппсала была своего рода Меккой методов фракционирования; фирма отсылает обоих паломников на консультацию к «верховному жрецу» электрофоретических методов — профессору Тизелиусу. В большом смятении выслушивают они суровый приговор мэтра: электрофоретическое разделение макромолекул, основанное на миграции к изоточке, осуществить невозможно ввиду их неизбежной изоэлектрической агрегации и преципитации.

И все же, несмотря на такое обескураживающее напутствие, идея обретает еще одного преданного и настойчивого приверженца в лице Х. Хаглунда, который, как и сам Свенссон, был когда-то учеником Тизелиуса, а в то время возглавлял небольшую группу в фирме LKB, занимавшуюся методами разделения. Будучи в курсе опытов Свенссона и Вестерберга, равно как

и скептических прогнозов Тизелиуса, Хаглунд и его коллеги Хольмстрём и Дэвис решились пустить «пробный шар». Им удалось вытянуть из отчаянно сопротивлявшейся фирмы около 60 000 шведских крон и наладить производство первых свенссоновых вертикальных градиентных колонок и первых партий вестерберговых амфолитов-носителей. Свою продукцию они предлагали экспериментаторам на бесплатную апробацию.

Кажется, что все это было только вчера. С тех пор прошло всего лишь 15 лет, и вот уже мне приходится в поте лица своего пожинать и перерабатывать неслыханный урожай — около 4500 научных публикаций по ИЭФ. Мне хочется надеяться на то, что Вы все же оцените результаты этого моего труда, воплотившиеся в настоящей книге.

Sic transit gloria mundi
Милан, 1 апреля 1982 г.
Пьер Джорджио Ригетти

Nihil obstat quominis imprimatur
(т. е. прочитано и одобрено X. Свенссоном и X. Хаглундом)

2nd imprimatur
(д-р Т. Уорк и проф. Р. Бардон)

Благодарности

Я крайне признателен д-ру Э. Джанацца, чей энтузиазм и преданность делу имели огромное значение для успешного хода исследовательских работ в нашей лаборатории. Хочу поблагодарить г-жу Тюдор, которой удалось с честью пройти сквозь суровые испытания, разбирая мой почерк, печатая и выправляя рукопись всей книги. Фирма LKB Produkter AB снабдила меня ценнейшим библиографическим сборником — полной подшивкой Acta Ampholinae. Теоретические выкладки и уравнения, приведенные в тексте, по большей части основаны на принципах, разработанных профессором Свенссоном (Рильбе), которому я очень признателен за неоценимую помощь. Я многим обязан проф. Р. Бардону и д-ру Т. Уорку, которые терпеливо и добросовестно проверили всю рукопись и придали ей окончательный вид. Наконец, хочу поблагодарить всех моих коллег, любезно предоставивших иллюстративный материал и экспериментальные данные, которые мне удалось включить в эту книгу.

Список сокращений и условных обозначений

АВХ — амфолит-вытеснительная хроматография
α_1-АТ — α_1-антитрипсин
БАЦ — N,N′-бисакрилцистамин
Бис — N,N′-метиленбисакриламид
БЭФ — «буферное» электрофокусирование
БСА — бычий сывороточный альбумин
ГМТА — гексаметилентетрамин
ГЭОА — гептаэтиленоктамин
ДАТД — N,N′-диаллилтартардиамид
ДГЭБА — N,N′-(1,2-дигидроксиэтилен)бисакриламид
ДДС-Na, или ДСН — додецилсульфат натрия
ДМАПМА — 3-диметиламинопропилметакриламид
ДМСО — диметилсульфоксид
ДМФ — диметилформамид
ИТФ — изотахофорез
ИЭФ — изоэлектрофокусирование
ПААГ — полиакриламидный гель
ППО — 2,5-дифенилоксазол
ПЭГА — пентаэтиленгексамин
ПЭИ — полиэтиленимин
ТАЦТ — N,N′,N″-триаллилцитраттриамид
ТЕМЭД — N,N,N′,N′-тетраметилэтилендиамин
ТММ — тетраметилмочевина
ТЭПА — тетраэтиленпентамин
ТЭТА — триэтилентетрамин
Трис — трис(гидроксиметил)аминометан
ФА — формамид
ЭДА — этилендиакрилат
ЭДТА — этилендиаминтетраацетат
ЭФ — электрофорез
D — коэффициент диффузии
Hb — гемоглобин
Hp — гаптоглобин
I — ионная сила раствора
Mb — миоглобин
M_r — молекулярная масса
pI — изоэлектрическая точка

Приводимые в тексте значения процентной концентрации растворов (%), как это принято в биохимической литературе, отражают количество растворенного вещества в граммах (для твердых веществ) или миллилитрах (для жидкостей), приходящееся на 100 мл раствора.

ГЛАВА 1

Теория и важнейшие аспекты изоэлектрофокусирования

Эта книга посвящена развитию теории и практики изоэлектрофокусирования (ИЭФ). Она предлагает детальную методологию широко используемых экспериментальных приемов (таких, как ИЭФ в геле) и может одновременно служить и библиографическим указателем, и практическим руководством. В первой части книги рассматриваются теоретические основы и развитие техники ИЭФ. Во второй части обсуждаются тактические и практические аспекты разнообразных препаративных и аналитических вариантов метода. Третья часть представляет собой обзор некоторых примеров использования ИЭФ для биологических и медицинских исследований. Предложенные примеры призваны проиллюстрировать необычайно широкие возможности метода изоэлектрического фракционирования.

1.1. История метода

Некоторые авторы склонны отсчитывать историю ИЭФ с момента опубликования работы Ikeda, Suzuki, 1912, посвященной выделению глутамата натрия с помощью электролизера, который состоял из трех отсеков, разделенных ионопроницаемыми мембранами. В дальнейшем эта конструкция с различными модификациями использовалась многими исследователями для разделения аминокислот и других амфолитов (Foster, Schmidt, 1926; Cox et al., 1929; Albanese, 1940; Theorell, Akesson, 1941; Sperber, 1946). Существенный шаг вперед был сделан в работе Williams, Waterman, 1929. Авторы увеличили число отсеков до 12, а также четко сформулировали принцип ступенчатого изменения pH при переходе от одного отсека к другому с установлением стационарного распределения pH и накоплением амфолитов при значениях pH, соответствующих их изоэлектрическим точкам (pI). Примечательна глубина проникновения авторов в сущность процесса фракционирования. В своей статье они отмечают, что «если некое соединение является амфолитом,

то можно полагать, что значение pH в той части раствора, где это соединение находится в максимальной концентрации, окажется близким к его pI. При любом другом значении pH, большем (или меньшем) pI, данный амфолит будет ионизирован преимущественно по кислотному (или соответственно по основному) типу. Это означает, что амфолит будет перемещаться в электрическом поле до тех пор, пока не попадет в зону со значением pH, при котором степень его кислотной ионизации сравняется со степенью основной ионизации, т. е. непосредственно в зону его pI».

Этот принцип был использован для выделения гормонов вазопрессина и окситоцина из экстракта гипофиза (Du Vigneaud et al., 1938). В одной из модификаций прибора мембранные перегородки были заменены соединением отсеков по принципу сифона (Williams, Truesdail, 1931). В работе Williams, 1935, описана цилиндрическая камера, состоящая из 61 отсека, которые имели форму сегментов, отделенных друг от друга перегородками. В еще одном варианте прибор состоял из шести колб Эрленмейера с боковыми горизонтальными отводами, расположенными на половине высоты колбы. Через эти отводные трубки колбы последовательно соединялись в ряд и функционировали подобно многокамерному электролизеру. Эти и многие другие подобные системы и экспериментальные приемы подробно рассмотрены в обзоре Svensson, 1948, посвященном препаративному электрофорезу.

Другой важной вехой в истории ИЭФ можно считать работу Тизелиуса по стационарному электролизу растворов амфолитов (Tiselius, 1941). В этой работе было показано, что при продолжительном электролизе достигается стационарное распределение концентраций электролитов и устанавливается равновесие между процессами электромиграции и тепловой диффузии. Тизелиус так описывал свои опыты: «Амфолит (помещенный в мультимембранный электролизер) отталкивается и от анода, и от катода, поскольку кислые растворы придают ему положительный заряд, а щелочные — отрицательный. Вследствие этого амфолит будет перемещаться до тех пор, пока не «отыщет» один или несколько отсеков с pH, равным его pI, где и останется все то время, пока идет процесс электролиза... Таким образом, в стационарном состоянии все анионы (в форме соответствующих кислот) располагаются в отсеках, примыкающих к аноду, все катионы (в форме гидроксидов) — в отсеках, примыкающих к катоду, а амфолиты — в промежуточных отсеках, при значениях pH, соответствующих их pI... Использование этого принципа для разделения амфолитов должно давать ряд существенных преимуществ. В частности, при миграционном фракционировании обычно трудно избежать значительного раз-

бавления компонентов, поскольку, как правило, передний фронт зоны мигрирует быстрее заднего вследствие так называемых «граничных искажений». В то же время описанный выше метод должен обладать концентрирующим эффектом по отношению к каждому из разделяемых компонентов».

Чем же объясняется тот факт, что, хотя уже к 1941 году изоэлектрическое фракционирование, казалось бы, достигло определенных успехов, понадобилось еще целых 25 лет, прежде чем появилась возможность говорить об истинном рождении метода ИЭФ? Одно из объяснений, по-видимому, связано с явлением, которое Колин образно охарактеризовал как «дефокусирование, или размывание идейных истоков. Этот процесс сводится к невольному искажению исторической перспективы и обычно принимает форму перенесения реального приоритета новых идей и открытий на некие другие (как правило, множественные) источники в отдаленном прошлом» (Kolin, 1977). В самом деле, те первые успехи в области электролиза амфолитов не смогли привести к современному изоэлектрофокусированию, поскольку тогдашние эксперименты лишь «скользнули» по поверхности этой обширной и глубокой области исследований. Следующий шаг в развитии методологии был сделан самим Колином в 1954—1955 гг. (Kolin, 1954, 1955 a, b, 1958, 1970). Он разработал принцип «фокусирования ионов в непрерывном градиенте pH» со стабилизацией градиентом плотности раствора сахарозы. Для описания характера распределения веществ, который реализуется в процессе фокусирования, им был предложен термин «изоэлектрический спектр». Формирование градиента pH достигалось благодаря диффузии буферных компонентов в электрическом поле; разделяемые вещества помещались на границе раздела между кислым и щелочным буфером в приборе типа аппарата Тизелиуса. В подобных «искусственных» градиентах pH Колину удавалось получать наборы изоэлектрических линий красителей, белков, клеток, микроорганизмов и вирусов за промежутки времени от 40 секунд до нескольких минут, т. е. с быстротой, для электрофоретических процессов и до сих пор немыслимой. В разделяющей ячейке Колина градиенту pH сопутствовали градиенты плотности, электропроводности и вертикальный температурный градиент. Конструкция ячейки, приведенная на рис. 1.1, свидетельствует о том, что сам метод был по тем временам весьма совершенным. Из плексигласового блока была изготовлена U-образная ячейка с электродными камерами, расположенными достаточно далеко от рабочего пространства, в котором происходило фракционирование (один из электродов показан на рисунке слева). В обе съемные плексигласовые стенки спереди и сзади были вмонтированы стеклянные или кварцевые окошки, позволяющие следить за ходом

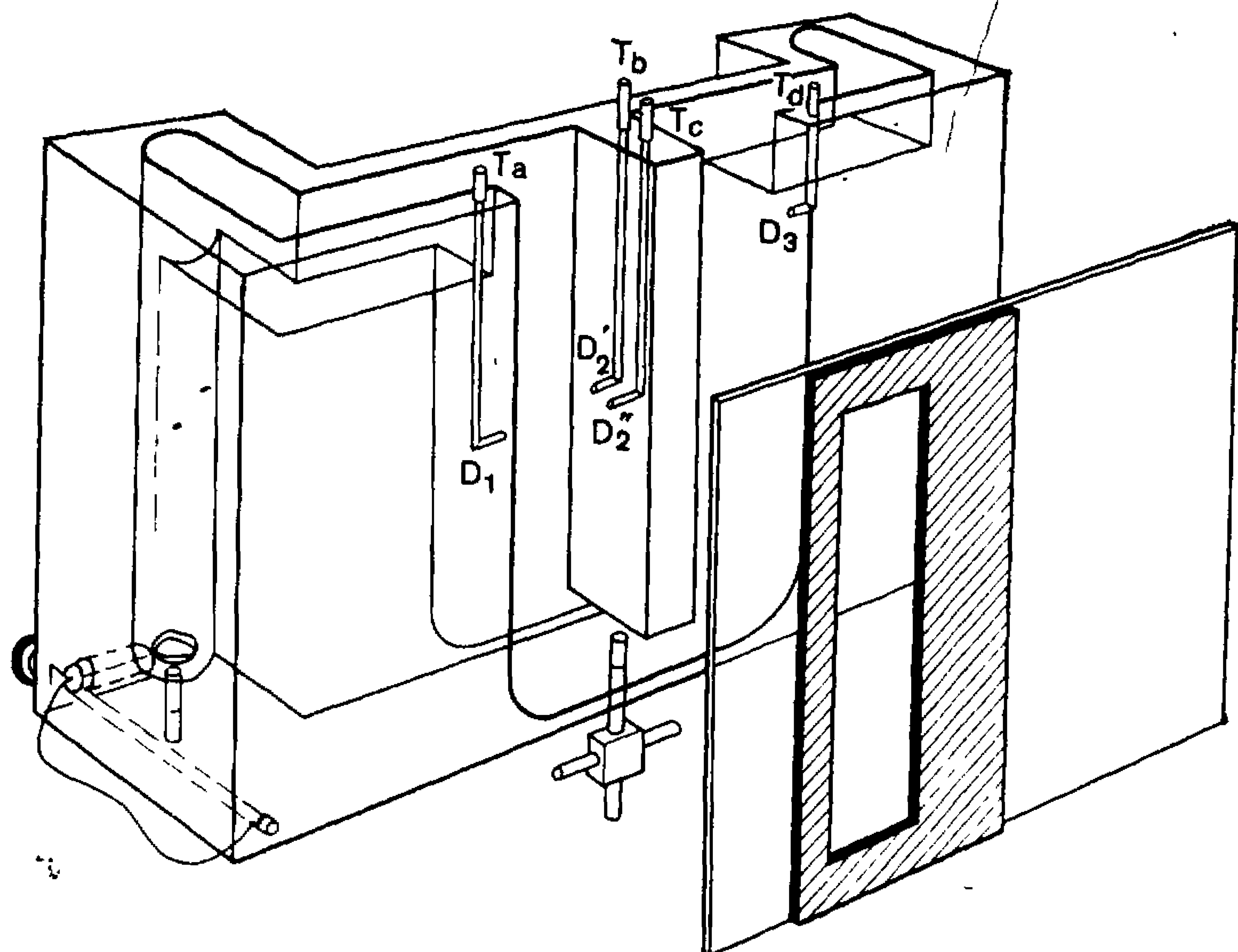


Рис. 1.1. Устройство ячейки для электрофоретического фракционирования. T_a, T_b, T_c и T_d — иглы для подкожных инъекций. D_1, D_2', D_2'' и D_3 — соответветствующие горизонтальные отводы. (Kolin, 1958.)

разделения в левом колене. В этом же колене, в котором, как правило, и проводилось фракционирование, были расположены капилляры D_1, D' и D'' для внесения образцов и отбора фракций по окончании процесса разделения. Первоначально эти капилляры были закреплены неподвижно на определенной высоте, что затрудняло извлечение компонентов, продвинувшихся на значительное расстояние от точки нанесения. Впоследствии Колин сконструировал усовершенствованную модель (рис. 1.2), включив в нее плунжер-отборник. Перемещаясь в вертикальном направлении, плунжер мог опускаться вниз по левому колену ячейки, что позволяло отбирать фракции по всему рабочему объему. Это давало и дополнительное преимущество, связанное с тем, что при погружении плунжера уровень жидкости в колене поднимался, в результате чего разрешение разделяемых компонентов увеличивалось пропорционально отношению площадей исходного и конечного сечений.

Весьма совершенной была и система оптической регистрации разделяемых веществ. В случае окрашенных образцов картина разделения в левом колене ячейки проецировалась на экран или небольшую стеклянную пластинку с матовой поверхностью и фотографировалась. Регистрация неокрашенных компонентов была основана на значительных изменениях коэффициента пре-

ломления света в зонах «изоэлектрических линий». За задней стенкой ячейки, со стороны левого колена, помещали трафарет в виде параллельных тонких черных линий (решетка Ронши), наклоненных под углом 45° к вертикальной оси электрофоретической колонки, и настраивали объектив для получения контрастной проекции. При этом наблюдалось заметное искривление линий за счет резкого изменения коэффициента преломления света на границах каждой из зон разделяемых компонентов. Этот остроумный и весьма эффективный способ регистрации сфокусированных зон недавно был «открыт» заново (Edwards, Anderson, 1981).

Итак, снова возникает вопрос: если уже в 1954 году и теория, и методология ИЭФ получили столь существенное развитие, то почему прошло еще 12 лет, прежде чем метод ИЭФ занял достойное место среди других, уже распространенных к тому времени методов фракционирования? Вероятно, дело было в том, что на этом этапе все еще недоставало одного важного «связующего звена», которое, как мне кажется, появилось и «замкнуло цепь» только с окончательной разработкой концепции «амфолитов-носителей» (Svensson, 1961). С позиции наших сегодняшних представлений сама идея, лежащая в основе этой концепции, может показаться достаточно очевидной, однако не следует забывать, что ее возникновению предшествовал не один десяток лет неудач и разочарований. Градиенты pH, которые Колину удавалось получать благодаря диффузии неамфотерных

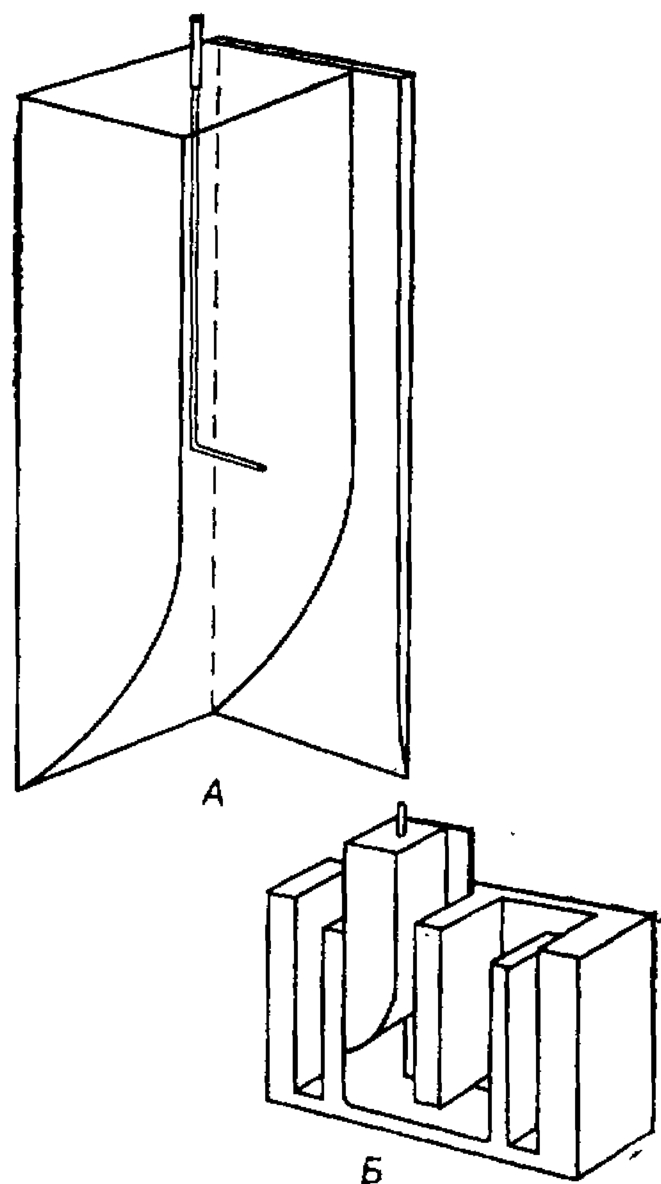


Рис. 1.2. Система для отбора фракций в U-образной ячейке Колина. *А*. Устройство плунжера, используемого в качестве пипетки для отбора материала зон, соответствующих линиям «изоэлектрического спектра». *Б*. Способ введения плунжера. (Kolin, 1958.)

буферов с различными исходными значениями pH в электрическом поле, в действительности были нестабильными (в работе Svensson, 1961, они называются «искусственными» градиентами pH). Форма подобного градиента постоянно изменяется из-за электромиграции и диффузии ионов с буферными свойствами. Наиболее благоприятные условия фракционирования удавалось получить, используя пару буферных растворов с одноименными ионами, например два фосфатных буфера с разными исходными значениями pH, между которыми лежит область значений pI разделяемых компонентов. И все же в градиентах этого типа можно было достичь лишь квазистационарного распределения амфотерных макромолекул. В своей блестящей теоретической работе Свенссон, опираясь на предложенное им понятие «амфолит-носитель», сформулировал необходимые и достаточные условия образования равновесного («естественного») градиента pH в электрическом поле (Svensson, 1961, 1962a, b). Буферные ионы, формирующие такой градиент pH, должны удовлетворять двум основным требованиям: 1) обладать амфотерными свойствами (для достижения стационарного распределения по длине колонки) и 2) проявлять свойства «носителей». Последнее требование не столь очевидное, но почти столь же основополагающее. Для ИЭФ можно использовать не любые амфолиты, а только «амфолиты-носители», т. е. амфотерные вещества, способные *переносить* ток (хорошая проводимость), а также *«привносить»* и поддерживать pH (хорошая буферная емкость). Именно благодаря появлению этой концепции и последующему элегантному синтезу амфолитов-носителей (Vesterberg, 1969, a) и сформировался метод ИЭФ в его современном виде.

1.2. Принципы ИЭФ

Принципиальные различия между ИЭФ и обычным электрофорезом проиллюстрированы на рис. 1.3. При обычном электрофорезе разделяемая смесь исходно вносится в виде узкой зоны, как правило со стороны катода. Разделение происходит в процессе вынужденной электромиграции образца в слое инертной матрицы (ацетилцеллюлоза, крахмал, агароза, полиакриламидный гель, сефадекс и т. п.), насыщенной буфером с определенным значением pH. В отсутствие заметных молекулярно-ситовых явлений белковые зоны мигрируют с постоянной скоростью, поскольку в данном буферном растворе они несут постоянный суммарный поверхностный заряд. В рассматриваемом примере (рис. 1.3) это отвечает миграции двух компонентов, А и Б, при постоянных значениях заряда, которые можно определить по кривым титрования. При данном фиксированном значении pH=9 суммарный поверхностный заряд для белков А и Б со-

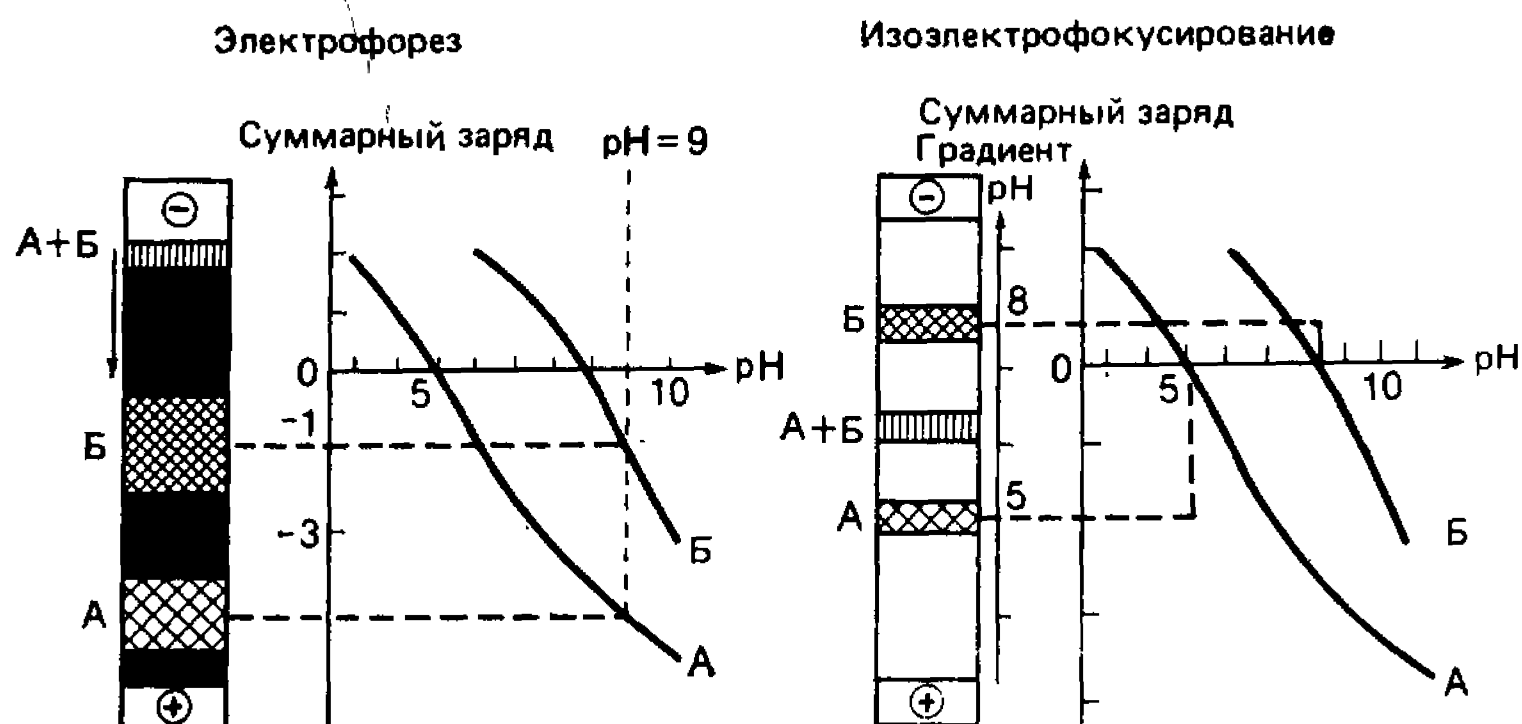


Рис. 1.3. Сравнение зонального электрофореза (*слева*) и ИЭФ (*справа*). В каждом случае проводится разделение смеси двух белков А (pI=5) и Б (pI=8), кривые титрования которых показаны справа. При обычном электрофорезе в среде поддерживается постоянное значение pH=9, при котором оба макроиона обладают постоянным суммарным отрицательным зарядом и мигрируют с постоянными скоростями (в отсутствие дифференцированных молекулярно-ситовых эффектов антиконвекционной среды разделения). В ходе фракционирования зоны диффундируют. В случае ИЭФ белки мигрируют с постоянно убывающей скоростью по направлению к стационарным зонам нулевого заряда (pH=pI). (С любезного разрешения фирмы LKB Produkter AB.)

ставляет −3 и −1 соответственно. По мере продвижения обоих компонентов от точки нанесения к аноду компонент А будет постоянно опережать Б. В то же время обе зоны в ходе электрофореза будут уширяться, поскольку в данной системе ничто не противодействует тепловой диффузии макромолекул. При обычном электрофорезе стационарное состояние в принципе недостижимо и процесс разделения необходимо прервать в какой-то момент прежде, чем произойдет элюция мигрирующих компонентов в анодную камеру.

При ИЭФ, напротив, устанавливается стабильный градиент увеличения pH в направлении от анода к катоду, формирующийся за счет электрофоретической «сортировки» амфолитов-носителей в подходящей антиконвекционной жидкой среде. Попадая в такую систему, белки или иные амфотерные молекулы начинают мигрировать в электрическом поле опять-таки в соответствии со своими значениями поверхностного заряда. Так, если некая молекула на данном участке градиента при данном значении pH заряжена положительно, то она будет мигрировать к катоду, т. е. в сторону увеличения pH. По мере такого продвижения положительный заряд этой молекулы будет уменьшаться, а отрицательный возрастать, например за счет депротонирования аминогрупп и карбоксилов. В итоге молекула достигнет такой зоны, где ее электрический заряд окажется рав-

ным нулю, т. е. зоны с pH, равным pI этой молекулы. Следовательно, в процессе ИЭФ скорость миграции белка постоянно уменьшается, поскольку его суммарный поверхностный заряд, соответствующий положению равновесия протонирования—депротонирования (которое в каждой точке определяется кривой титрования данного белка), также уменьшается, стремясь к нулю. В конце концов миграция белковой молекулы полностью прекращается. Как только молекула случайно выйдет за пределы зоны pI, она тотчас приобретет отличный от нуля заряд и вынуждена будет вернуться к равновесному положению. Таким образом, электрическое поле прямо противодействует диффузии, и при соответствующих условиях белки или иные амфотерные макромолекулы достигают своего равновесного положения, вблизи которого они концентрируются в виде необычайно узких зон. Как и следовало ожидать, разделение двух амфолитов, помимо всего прочего, определяется крутизной градиента pH, в котором происходит фокусирование. При данной геометрии разделительной колонки (при неизменной длине пути) разрешение тем выше, чем положе градиент (см. рис. 1.4).

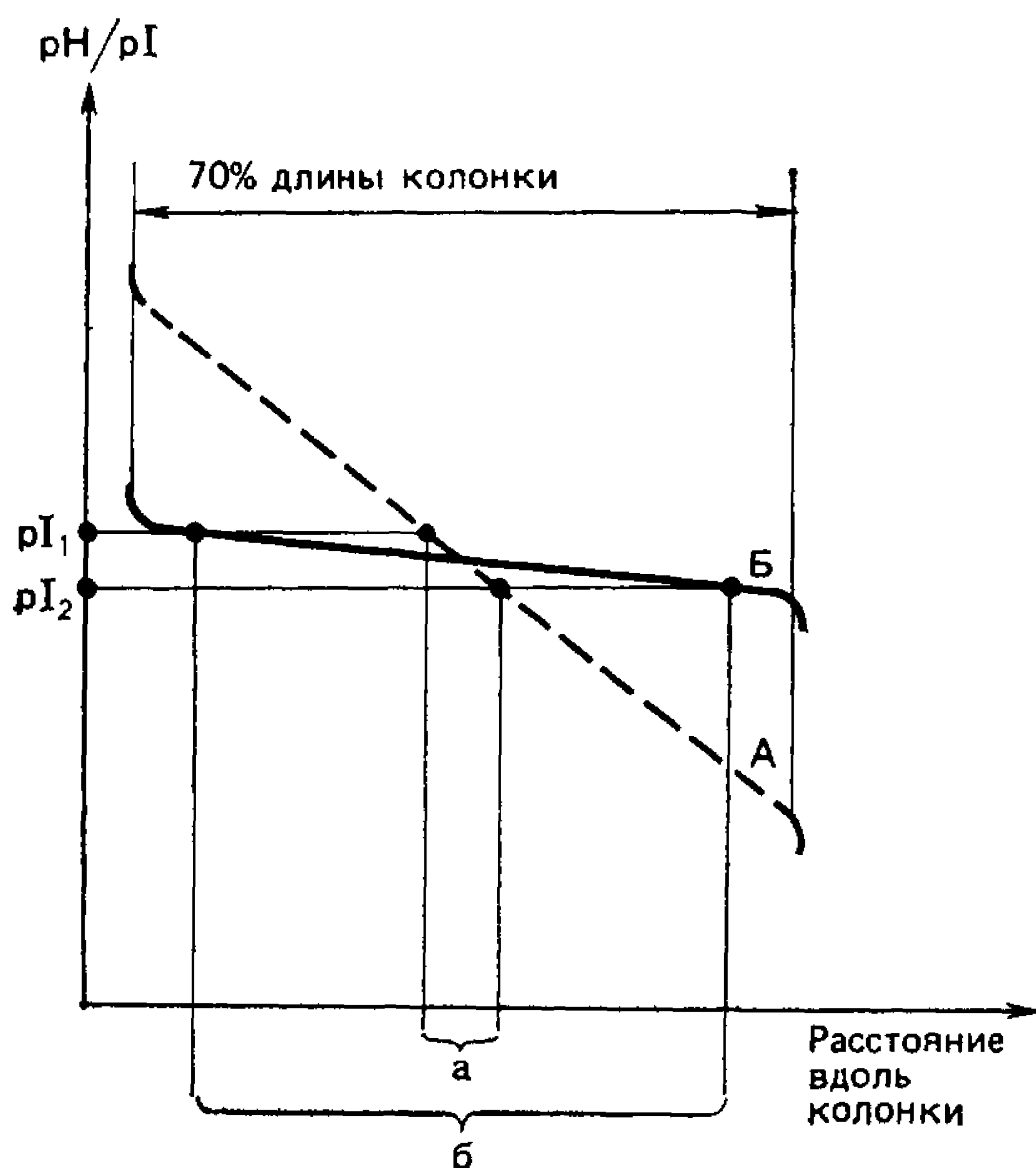


Рис. 1.4. Разделение амфолитов в зависимости от крутизны градиента pH. В крутом градиенте pH (пунктирная линия А) два типа амфотерных молекул с изоточками pI_1 и pI_2 расходятся лишь на небольшое расстояние (а). В более пологом градиенте pH (сплошная линия Б) разрешение значительно выше (расстояние б). (С любезного разрешения LKB Produkter AB.)

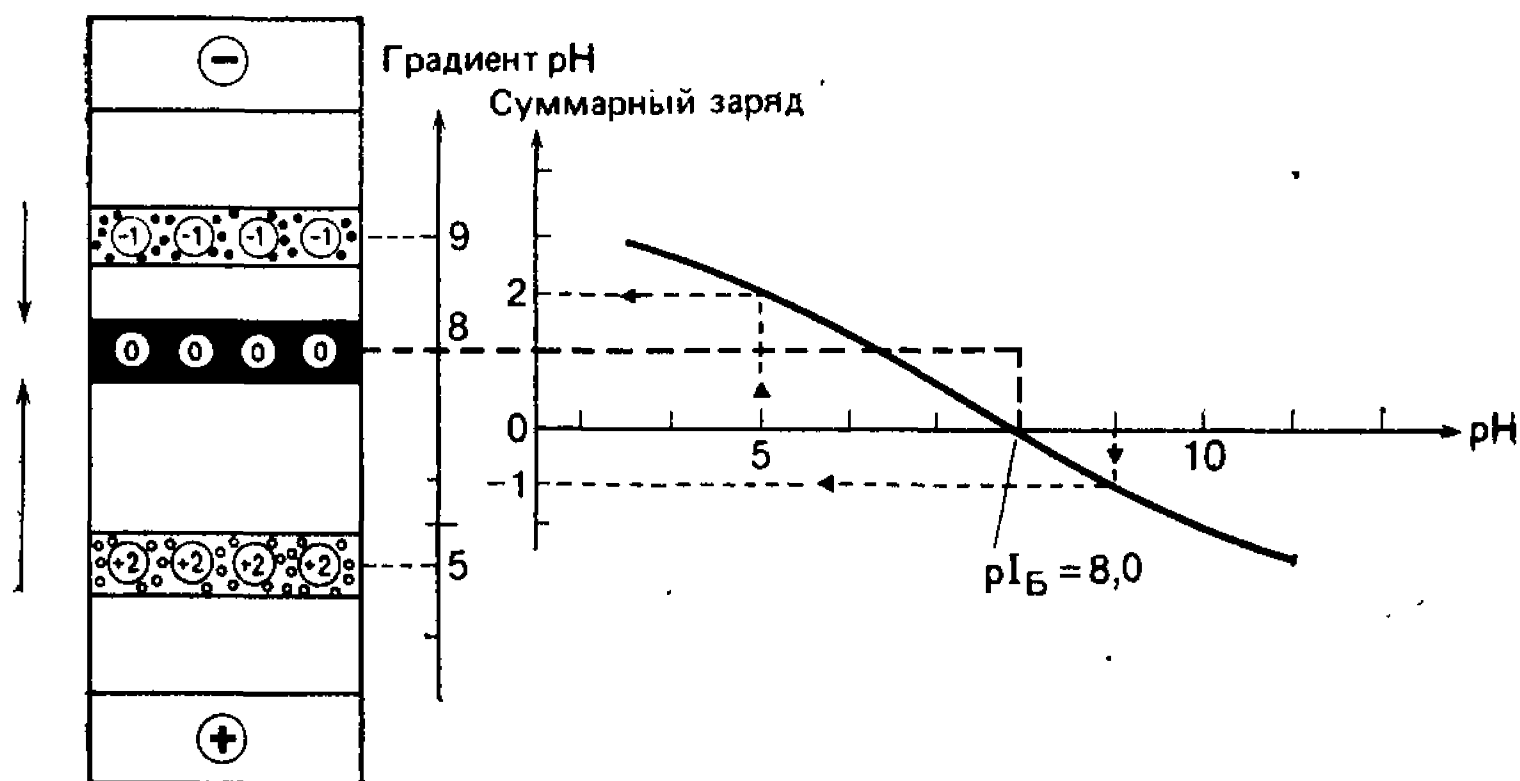


Рис. 1.5. Эффект фокусирования, или конденсирования, при ИЭФ. Один и тот же белок (Б, pI=8,0) вносят в гель с предварительно сфокусированным градиентом pH двумя порциями — у катода (зона отрицательного заряда) и у анода (зона положительного заряда для данного белка). Обе исходные зоны будут мигрировать навстречу друг другу и в итоге конденсироваться, или фокусироваться, в виде одной зоны нулевого заряда и нулевой подвижности. Справа приведена кривая зависимости подвижности (заряда) белка от pH среды. (С любезного разрешения LKB Produkter AB.)

В дальнейшем это положение будет рассмотрено более обстоятельно (разд. 1.5.7).

Явление «фокусирования», или «конденсирования», в изоточке проиллюстрировано на рис. 1.5. После внесения одного и того же белкового иона (pI=8) в заранее сформированный градиент pH в виде двух зон — со стороны катода (при pH9) и со стороны анода (при pH5) — эти зоны приобретут заряды противоположного знака, т. е. отрицательный и положительный соответственно. Это приведет к их встречной миграции вплоть до полного слияния в одну зону, содержащую белковые молекулы с нулевым суммарным зарядом и нулевой подвижностью (pH=pI=8). В этой стационарной зоне достигается динамическое равновесие между тепловой диффузией и электрофоретической миграцией по направлению к изоточке.

Изначально ИЭФ было разработано как препаративный метод. Фракционирование проводили в градиенте плотности раствора сахарозы, который служил антиконвекционной средой, стабилизирующей градиент pH и сфокусированные белковые зоны. Эксперименты обычно выполняли в колонках объемом 110 или 440 мл; равновесие устанавливалось лишь через 2—4 сут. Проведение ИЭФ в этих условиях требовало большой затраты времени и тщательной стандартизации всех условий эксперимента. Определенные сложности возникали в связи с изоэлектрической преципитацией образцов, а также в связи с размыванием зон

при опорожнении колонки в отсутствие электрического поля. Процесс регистрации сфокусированных зон был весьма кропотливым, а иногда и едва ли не безнадежным делом. Разумеется, в таком варианте метод был явно непригоден для проведения рутинных анализов. Многие недостатки, присущие методу ИЭФ в градиенте плотности, удалось преодолеть с введением более удобных антиконвекционных систем, таких, как полиакриламидный гель, сефадекс или агарозная матрица. Это позволило полностью реализовать необычайно широкие возможности ИЭФ — высокоэффективного метода разделения амфотерных макромолекул. Методология ИЭФ в геле в настоящее время достаточно хорошо разработана как для аналитического, так и для препаративного вариантов разделения. В заключение отметим, что ИЭФ в геле — это на редкость благодарное занятие, поскольку при минимуме квалификации и вложенного труда экспериментатор получает высококачественные результаты.

1.3. Обобщение принципа ИЭФ

В своей недавней работе, посвященной истории метода, Колин заметил, что ИЭФ в определенном смысле можно рассматривать как «нулевой» метод, так как в процессе разделения частицы достигают равновесного положения и фокусируются в зонах «нулевой» силы (Kolin, 1977). Проанализировав теоретические основы ИЭФ, он пришел к выводу, что его можно включить в особую группу методов, основанных на принципе «изоперихорического фокусирования» (от iso — «одинаковые» и

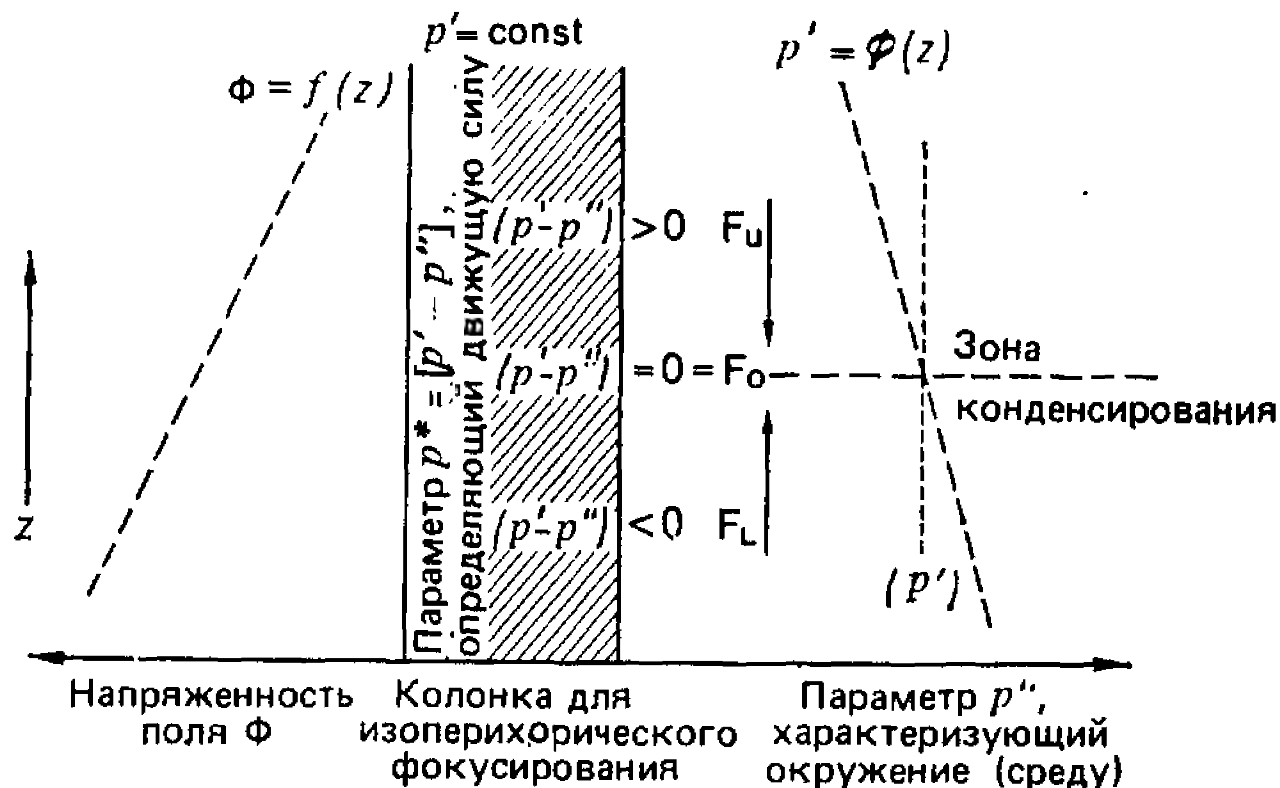


Рис. 1.6. Изоперихорическое фокусирование. Внутри колонки создается среда, характеризующаяся параметром p'', который постепенно изменяется вдоль оси z $[p''=\varphi(z)]$. Частицы вещества, характеризующиеся значением p' соответствующего параметра, произвольным образом распределены в разделительной колонке. Предполагается, что в градиенте p'' имеется точка, в которой $p'=p''$ (зона фокусирования, или конденсирования). (Kolin, 1977.)

perichoron — «окружение»). Общая особенность подобных методов заключается в том, что разделяемые компоненты, «мигрирующие в поле движущей силы вдоль концентрационного градиента, распределяются по колонке в виде узких стационарных зон. Внутри этих зон устанавливается такое соотношение между определенными физическими параметрами частиц данного типа и соответствующими параметрами поддерживающей среды, что для этих частиц движущая сила стремится к нулю. К процессам такого типа можно отнести изопикническое, изокондуктивное, изодиэлектрическое, изомагнитное, изопарамагнитное и изодиамагнитное фокусирование». На рис. 1.6 представлена обобщенная схема процесса изоперихорического фокусирования. К разделительной ячейке (или изоперихорической фокусирующей колонке) прикладывается поле напряженностью $\Phi=f(z)$. Специфическая химическая среда $p''=\varphi(z)$ внутри колонки формируется предварительно или возникает непосредственно за счет действия поля. Эта среда фактически выступает в роли источника противодействующей силы, которая, придя в соответствие с неким физико-химическим параметром p' данного соединения, уравновешивает внешнюю движущую силу Ф. Таким образом, это соединение попадает в зону динамического равновесия двух противоположно направленных сил F_U и F_L и остается в ней. В табл. 1.1 охарактеризованы равновесные методы разделения, нашедшие применение в биохимии. Это — изопикническое центрифугирование, изоэлектрофокусирование и электрофорез в градиенте пористости геля.

Как показано в работе Giddings, Dahlgren, 1971, некоторые параметры, характеризующие процесс разделения при ИЭФ и

Таблица 1.1. Равновесные методы фракционирования

Метод	Поддерживающая среда	Определяемый параметр	Нижний предел разрешения
Изоэлектрическое фокусирование	Сахароза, полиакриламидный или агарозный гель	pI[1]	0,005 pI[4]
Изопикническое центрифугирование	Сахароза, CsCl	ρ[2]	0,003 ρ[5]
Электрофорез в градиенте пористости геля	Полиакриламидный гель	R_S[3]	3 000 дальтон[6]

[1] Изоэлектрическая точка.
[2] Плотность (г/см³).
[3] Стоксов радиус.
[4] *Allen R. C., Hasley, R. A., Talamo R. C.* (1974). Am. J. Clin. Pathol. **62**, 732—739.
[5] *Dawin I. B., Wolstenholme D. R.* (1968). Biophys. J. 8, 65—70.
[6] Для глобулярных белков. *Margolis J., Kenrick K. G.* (1968). Anal. Biochem. **25**, 347—362.

равновесном центрифугировании, определяются при помощи однотипных уравнений. Это отражает глубокую аналогию существа процессов, лежащих в основе этих методов. Примечательно, что в истории развития методов фракционирования два таких события, как появление концепций изопикнического центрифугирования (Meselson et al., 1957) и ИЭФ (Svensson, 1961), произошли совершенно независимо и лишь с небольшим разрывом во времени. В обоих методах формирование среды с изменяющимися свойствами (градиент плотности или градиент pH) в разделительной ячейке происходит непосредственно под действием внешнего поля. Следует отметить, что в обоих случаях градиент значения параметров среды и внешнее поле действуют в противоположных направлениях. В противном случае, т. е. при одинаковой направленности градиента и поля, разделяемые частицы стремились бы выйти из зоны фокусирования (Kolin, 1977).

Для третьего метода — градиентного электрофореза — конечное стационарное распределение разделяемых компонентов недостижимо: в лучшем случае наблюдается асимптотическое уменьшение их подвижности. Поэтому можно усомниться, следует ли причислять этот метод к категории равновесных (Chrambach, Robard, 1971). Тем не менее при электрофорезе в пластине градиентного ПААГ (особенно при электрофорезе в присутствии додецилсульфата натрия) с использованием подходящего набора стандартных белков удается определить истинные значения молекулярной массы и гидродинамического радиуса исследуемых компонентов (Gianazza, Righetti, 1979 a).

Для всех упомянутых выше методов характерна очень высокая разрешающая способность, недостижимая для других, неравновесных способов фракционирования. Помимо того, при использовании этих методов удается достичь не только высокой степени очистки, но одновременно и определить те или иные физико-химические параметры разделяемых макромолекул (например, плавучую плотность, изоэлектрическую точку, молекулярную массу или стоксов радиус). Совокупность этих параметров, отражающих химический состав (первичную структуру) и пространственную конфигурацию макромолекул, может быть использована в качестве однозначной характеристики для обнаружения макромолекул определенного вида.

1.4. Книги и обзоры, посвященные ИЭФ

Само собой разумеется, что данная монография едва ли в состоянии детально осветить все разнообразные аспекты ИЭФ. Начиная с того времени, когда этот метод сформировался в его современном варианте, и вплоть до 1981 г. появилось более

4500 публикаций, посвященных использованию ИЭФ, состоялось восемь международных симпозиумов по ИЭФ и другим электрофоретическим методам. За дополнительной информацией читатель может обратиться к материалам этих симпозиумов (Castimpoolas, 1973 a; Allen, Maurer, 1974; Arbuthnott, Beeley, 1975; Righetti, 1975 a; Radola, Graesslin, 1977; Castimpoolas, 1978; Radola, 1980 c; Allen, Arnaud, 1981). В апреле 1982 г. в Афинском университете (Греция) состоялся IX Международный симпозиум по электрофоретическим методам, организованный Д. Статакосом. X симпозиум состоялся в 1983 г. в Токио под общим руководством профессора X. Хираи. Материалы обоих симпозиумов опубликованы издательством De Gruyter (Западный Берлин).

Основные теоретические и методические аспекты ИЭФ рассмотрены в книге Castimpoolas, 1976, а применение этого метода в биологии и медицине — в издании Castimpoolas, Drysdale, 1977. Весьма интересна монография, посвященная электрофоретическому и изоэлектрическому анализу клеток млекопитающих, субклеточных органелл, бактерий и вирусов (Sherbert, 1978). Общие вопросы ИЭФ рассмотрены в книге «Электрокинетические методы разделения» (Righetti et al., 1979 c). Книга состоит из 21 главы, в которых описаны всевозможные варианты и аспекты процессов электрофоретического фракционирования. Вопросы, связанные с ИЭФ, обсуждаются в отдельных главах различных книг: Just, Werner, 1979 (методы разделения в потоке); Quast, 1979 (ИЭФ в свободной фазе); Chrambach, Nguyen, 1979 (препаративные аспекты); Cann, 1979 (взаимодействия между белками и амфолитами-носителями); Righetti, 1979 (общее состояние проблемы).

До выхода в свет этой книги было опубликовано лишь одно практическое руководство, целиком посвященное проблемам ИЭФ (Righetti, Drysdale, 1976). В то же время за годы существования метода появилось множество обзоров по ИЭФ. По-видимому, наиболее существенную роль в процессе обучения биохимиков основам метода сыграл один из них — обзор Haglund, 1971. Он содержал глубокий и исчерпывающий анализ состояния проблемы и в течение ряда лет был вне всякой конкуренции, являясь своего рода «Summa Theologica» в области ИЭФ. Следует отметить еще ряд обзоров, охватывающих такие направления, как общая методология ИЭФ (Vesterberg, 1968, 1970 a, 1971 a, 1973 a, b, 1978; Righetti, Drysdale, 1974), теоретические аспекты (Castimpoolas, 1970, 1973 a, 1975 a; Rilbe, 1973 a), ИЭФ иммуноглобулинов (Williamson, 1973), ИЭФ белков зерновых культур и других продуктов питания (Du Gros, Wrigley, 1979; Wrigley, 1973, 1977; Bishop, 1979; Righetti, Bianchi Bosisio, 1981), препаративные аспекты ИЭФ (Rilbe, 1970; Righetti,

1975 a), применение в биохимии и медицине (Latner, 1975; Righetti et al., 1976; Allen, 1978; Righetti et al., 1979), сравнительный анализ методических аспектов ИЭФ, электрофореза и изотахофореза (Chrambach, 1980), последние достижения в развитии метода (Righetti et al., 1980 a, b), применение зимограмм (Wadström, Smyth, 1973) и использование pH-маркеров при ИЭФ (Bours, 1973 d). С анализом методологии ИЭФ можно также ознакомиться в соответствующих разделах общих руководств по биохимическим методам разделения (Morris, Morris, 1976; Leaback, Wrigley, 1976). Определенный интерес представляют сводные таблицы (Righetti, Caravaggio, 1976; Righetti et al., 1981 a), включающие перечень физико-химических характеристик более чем 1200 ферментов и структурных белков прокариот и эукариот. Приведены значения pI (полученные на основании ИЭФ), а также молекулярные массы целых белков и отдельных субъединиц. Во всех случаях указан вид организма-продуцента, а в случае эукариотических белков — орган и внутриклеточная локализация. Таблицы охватывают данные, появившиеся в литературе с момента возникновения ИЭФ (около 1966 г.) по 1979 г., и могут служить весьма полезным справочным пособием для специалистов в области химии белков.

1980 год был ознаменован рождением Электрофоретического общества (Electrophoresis Society) с его официальным органом — журналом Electrophoresis (издательство Verlag-Chemie). По-видимому, именно в этом журнале будет публиковаться большинство работ, связанных с новыми методическими аспектами и применением ИЭФ. Существуют и некоторые другие издания, где можно найти соответствующие работы: Journal of Biochemical and Biophysical Methods (Elsevier), Analytical Biochemistry (Academic Press) и (в меньшей степени) J. Chromatography (Elsevier). Можно отметить также полезное периодическое библиографическое издание Acta Ampholinae, публикуемое LKB Produkter AB. Выпущен сводный том по литературе с 1960 по 1974 г.; каждый год выходят дополнения, охватывающие библиографию по ИЭФ и изотахофорезу. Как уже упоминалось, к моменту подготовки настоящей монографии (конец 1981 г.) насчитывалось более 4500 публикаций, посвященных ИЭФ.

1.5. Теория и важнейшие аспекты ИЭФ

В этом разделе приведены основные уравнения, описывающие процесс ИЭФ. С более подробным математическим описанием можно познакомиться в ранних работах Свенссона (Svensson, 1961, 1962 a, b), а также в позднейших публикациях, посвященных анализу и дальнейшему развитию теории ИЭФ (Rilbe, 1971,

1973 а, 1976; Almgren, 1971; Giddings, Dahlgren, 1971). Хотя отдельные положения этой теории в дальнейшем были в значительной мере пересмотрены (особенно в том, что касается нарушения стационарности при ИЭФ в геле, а также несоблюдения принципа монотонности градиента pH, электропроводности и буферной емкости), до сего дня не предложено никаких альтернативных концепций и теория Рильбе (Свенссона) не утратила своего основополагающего значения.

1.5.1. Искусственный градиент pH

Градиенты pH, образующиеся вследствие диффузии в электрическом поле неамфотерных буферов с различными исходными значениями pH (Kolin, 1954, 1955, 1958), были названы «искусственными» (Svensson, 1961). Градиенты такого типа неустойчивы и в процессе электромиграции и диффузии ионов непрерывно изменяются. Как уже упоминалось, наиболее благоприятные условия разделения достигаются в случае пары буферных растворов с одноименными ионами, например двух ацетатных буферов с разными исходными значениями pH, перекрывающими область значений pI разделяемых компонентов. При фракционировании в подобных искусственных градиентах можно ожидать лишь квазистационарного распределения амфотерных молекул.

1.5.2. Естественный (равновесный) градиент pH

В начале 60-х годов впервые была сформулирована концепция «естественного» градиента pH, положенная в основу теории метода ИЭФ в его современном виде (Svensson, 1961). Такой градиент, формируемый непосредственно под действием электрического поля, в отсутствие конвекции должен оставаться неизменным длительное время. Это значит, что ИЭФ может считаться истинно равновесным методом разделения. Аналогичный принцип, как уже упоминалось, лежит в основе метода равновесного (изопикнического) центрифугирования в градиенте плотности. Было показано, что формулы, с помощью которых определяются некоторые параметры, в том числе разрешающая способность, для обоих методов имеют аналогичный вид (Giddings, Dahlgren, 1971). Свенссон предсказал, что устойчивый градиент pH удастся получить за счет изоэлектрического распределения широкого спектра амфолитов-носителей по длине колонки. Под действием электрического поля амфолиты должны распределяться по принципу возрастания pI от анода к катоду. Тогда значение pH на любом участке градиента должно определяться только буферной емкостью и электропроводностью

амфолита, который находится на данном участке градиента в своем изоэлектрическом состоянии. Следует отметить, что на устойчивость градиента pH могут влиять и такие факторы, как конвекция и диффузия. Во избежание конвекционного перемешивания электрическая нагрузка в системе не должна быть слишком большой, чтобы выделяющееся тепло успевало рассеиваться. В идеальном случае электропроводность должна быть постоянной на протяжении всего градиента для предотвращения локального перегрева, который может возникнуть на участке с низкой концентрацией амфолитов или на участке, содержащем амфолиты с низкой электропроводностью и буферной емкостью. Причиной неустойчивости градиента pH может оказаться анодное окисление или катодное восстановление амфолитов-носителей. Исходя из этого для предотвращения контакта амфолитов с электродами было предложено в качестве электролитов использовать сильные основания и сильные кислоты.

1.5.3. Общее дифференциальное уравнение ИЭФ

Для идеального стационарного состояния при ИЭФ было получено следующее дифференциальное уравнение, отражающее динамическое равновесие процессов электрофоретической миграции и диффузии (Svensson, 1961):

$$\frac{d(CuE)}{dx} = \frac{d}{dx} D \frac{dC}{dx}, \qquad (1)$$

где C — концентрация белка внутри разделительной колонки в точке с координатой x, u — подвижность белка в этой точке, E — напряженность поля, D — коэффициент диффузии белка. После интегрирования уравнения получаем

$$CuE = D \frac{dC}{dx} + \text{const}. \qquad (2)$$

Это соотношение должно выполняться в любой точке колонки, в том числе и за пределами зоны фокусирования данного белка, где его концентрация равна нулю. Таким образом, постоянная интегрирования равна нулю:

$$CuE = (dC/dx)\,D \qquad (3)$$

Это и есть общее дифференциальное уравнение, описывающее стационарное состояние, которое достигается в процессе ИЭФ. Уравнение (3) не распространяется на сильные электролиты, для которых стационарное состояние недостижимо, например на соли, которые при любом pH полностью диссоциированы. Это уравнение не выполняется также и в случае неэлектролитов,

таких, как сахароза, сорбитол или глицерин, которые часто применяются при ИЭФ для защиты от конвекции. Наличие градиента концентрации неэлектролита не сказывается на уравнении (3) в том случае, если в процессе ИЭФ этот градиент остается практически неизменным. Теоретически уравнение (3) можно распространить на случай кислот и оснований, которые мигрируют к аноду и к катоду и там концентрируются. Таким образом, накопление одной свободной кислоты у анода и одного свободного основания у катода вполне удовлетворяет требованиям стационарности процесса. Однако при наличии смеси нескольких различных оснований и (или) кислот их распределение может оказаться нестационарным. Так, если к аноду одновременно мигрируют две кислоты — сильная и слабая, то быстрее накапливается сильная кислота, поскольку она подавляет диссоциацию слабой кислоты. Электрофоретическая миграция слабой кислоты прекращается, но она продолжает диффундировать к аноду. Поскольку этот диффузионный процесс не компенсируется процессом электромиграции, то и стационарное состояние не реализуется (см. также разд. 1.11.5). Компоненты, которые сами не достигают стационарного положения, могут постепенно изменять условия, обеспечивающие стационарное распределение других компонентов. Это распределение становится квазистационарным, начинается постепенное перемещение сфокусированных зон.

1.5.4. Буферная емкость в изопротонном состоянии

Молярная буферная емкость (B_1) амфолита в изопротонном состоянии (которое совпадает с изоэлектрическим состоянием в том случае, если катионная и анионная формы молекулы обладают одинаковой абсолютной подвижностью) задается формулой (Rilbe, 1976)

$$B_1=(\ln 10)/(1+s), \qquad (4)$$

где параметр s определяется как

$$s=f\,(K_1/4K_2)^{1/2}; \qquad \log s=(1/2)\Delta pK+\log (f/2), \qquad (5)$$

т. е. B_1 зависит от фактора активности f и от двух констант диссоциации K_1 и K_2 бивалентного амфолита. Максимальная буферная емкость одноосновных слабых кислот или оснований, т. е. их буферная емкость при $pH=pK$, составляет

$$B_1=(\ln 10)/4. \qquad (6)$$

Относительная буферная емкость (b_1) определяется как отношение (4) к (6):

$$b_1=4/(1+s). \qquad (7)$$

Поскольку это отношение заведомо не превышает 2, то параметр s не может быть меньше единицы ($s \geqslant 1$). Тогда из соотношения (5) можно получить следующее выражение для бивалентных амфолитов:

$$\Delta pK' = pK_2' - pK_1' \geqslant \log 4, \qquad (8)$$

где $K_1' = fK_1$ и $K_2' = K_2/f$ — это стехиометрические константы диссоциации. Уравнения (7) и (8) показывают, что буферная емкость в изопротонном состоянии уменьшается с ростом параметра s, т. е. с увеличением ΔpK, сначала по линейному, а затем по экспоненциальному закону. Так, из рис. 1.7 видно, что, если разность между значениями pK_1 и pK_2 составляет 1,5 единицы pH, то сохраняется около 50% максимальной буферной емкости. Однако при $(pK_2 - pK_1) = 3,2$ буферная емкость уже в 10 раз меньше максимальной и амфолит следует считать «плохим» амфолитом-носителем. Таким образом, у «хорошего» амфолита-носителя оба значения pK должны быть максимально близки к его pI. Амфолиты, содержащие не две, а множество диссоциирующих функциональных групп, характеризуются одним суммарным значением pK.

Из рис. 1.7 видно, что, когда s стремится к предельному значению, т. е. к 1 ($\log s = 0$), переменные α_i, b_i и ΔpK также стремятся к своим предельным значениям: к максимальной степени ионизации $\alpha_i = 0,5$, максимальной буферной емкости $b_i = 2$ и минимальному значению $\Delta pK = 0,6$ соответственно. При $\Delta pK < 0,6$ величины pK_1' и pK_2' уже по существу не отвечают двум независимым равновесным протолитическим процессам, а являются своего рода «гибридными» константами диссоциации (MacInnes, 1939).

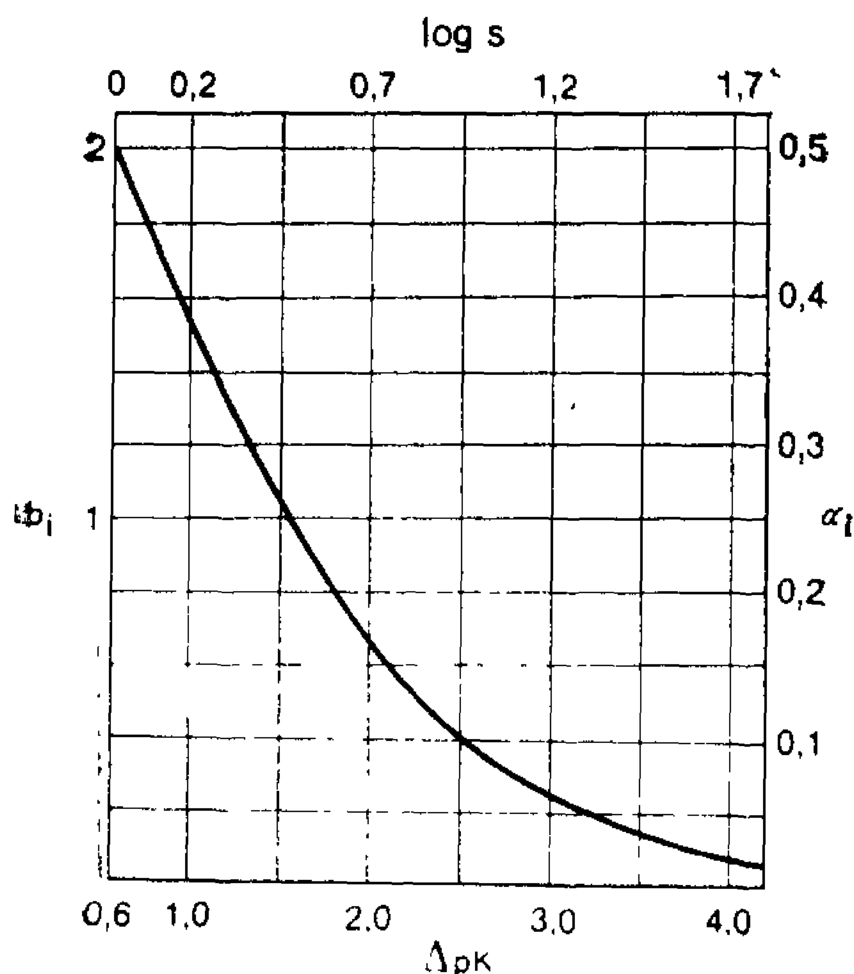


Рис. 1.7. Относительная буферная емкость (b_i) и степень ионизации (α_i) двухвалентного амфолита в изопротонном состоянии как функция ΔpK и логарифма параметра s, определяемого формулой (5). (Rilbe, 1976.)

1.5.5. Электропроводность в изопротонном состоянии

Для того чтобы быть «хорошим» амфолитом-носителем, соединение должно непременно обладать хорошей электропроводностью при pH=pI. На участках с низкой электропроводностью не только происходит локальный перегрев, на них теряется значительная часть общего падения напряжения. Это приводит к ослаблению поля и соответственно к уменьшению разрешения на других участках градиента.

Степень ионизации бивалентного амфолита может быть записана как

$$\alpha=\frac{C_{амф_+}+C_{амф-}}{C_{амф}}, \qquad (9)$$

где $C_{амф+}$ — молярная концентрация катионной формы, $C_{амф-}$ — молярная концентрация анионной формы и $C_{амф}$ — общая молярная концентрация амфолита в виде ионов и недиссоциированных молекул. Пренебрегая коэффициентами активности, из закона действующих масс можно вывести следующие уравнения:

$$C_{амф_+}=C_{амф_0}(10^{pK_1-pH}), \qquad (10)$$

$$C_{амф_-}=C_{амф_0}(10^{pH-pK_2}), \qquad (11)$$

где $C_{амф_0}$ — суммарная молярность цвиттерионной и недиссоциированной форм.

Общая молярная концентрация амфолита равна

$$C_{амф}=C_{амф_+}+C_{амф_-}+C_{амф_0}. \qquad (12)$$

Избавляясь в уравнениях (10) и (11) от $C_{амф_0}$, после преобразования получаем

$$C_{амф}/C_{амф_+}=1+10^{pH-pK_1}+10^{2(pH-pI)}, \qquad (13)$$

$$C_{амф}/C_{амф-}=1+10^{pK_2-pH}+10^{2(pI-pH)}. \qquad (14)$$

Для бивалентного амфолита значения pK (принимаем, что pK_1<pK_2) и pI связаны соотношением

$$pI=\frac{pK_1+pK_2}{2}. \qquad (15)$$

Подставляя соответствующие выражения из (13), (14) и (15) в формулу (9), получаем для степени ионизации амфолита в изоэлектрическом состоянии (pH=pI)

$$\alpha=\frac{2}{2+10^{pI-pK_1}}. \qquad (16)$$

Максимальная электропроводность соответствует максимальному значению $\alpha=1/2$ при минимальном значении разности

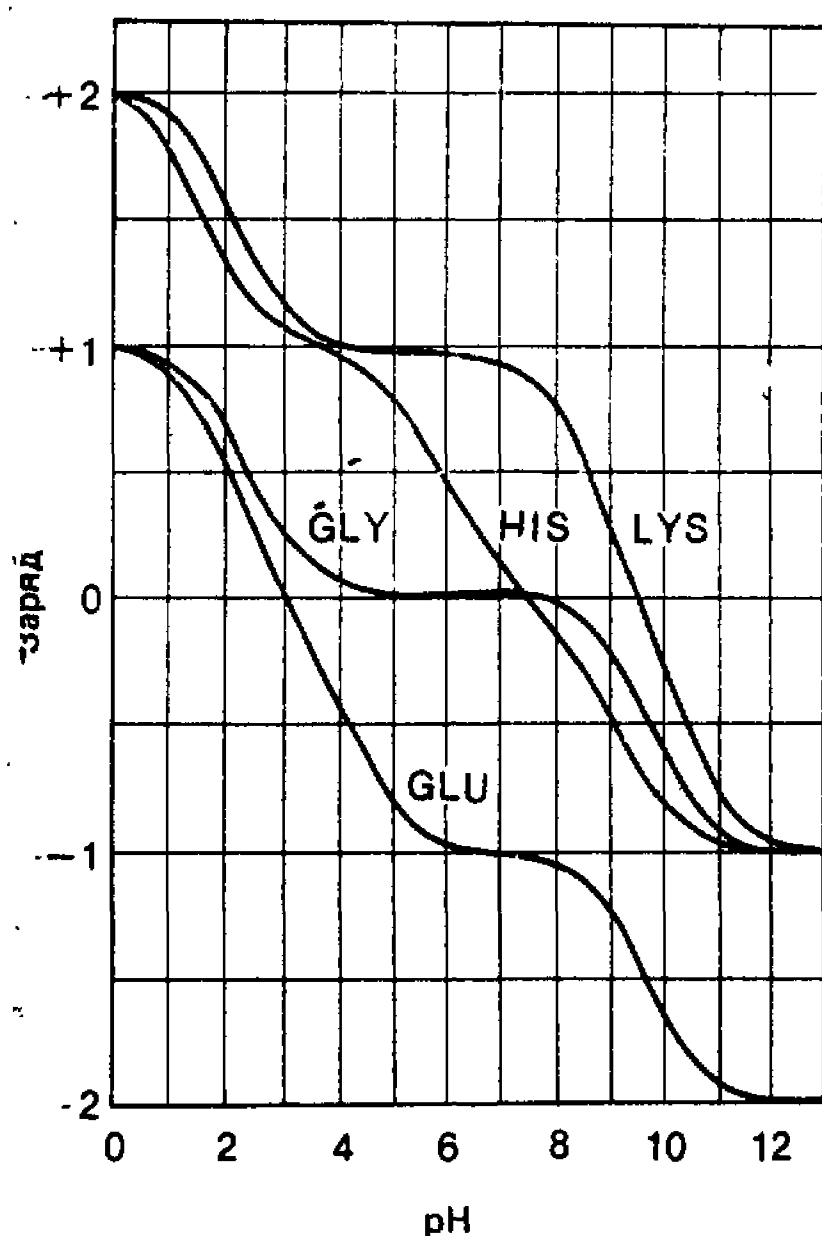


Рис. 1.8. Кривые титрования глутаминовой кислоты, глицина, гистидина и лизина. Три аминокислоты из этого набора, обладающие четкими изоионными точками (разность $pI—pK_1$ мала), являются достаточно эффективными амфолитами-носителями. В то же время глицин, который находится в изоэлектрическом состоянии в широком диапазоне pH, можно считать «плохим» амфолитом-носителем. (Svensson, 1962a.)

$pI—pK_1=\log 2$ (Svensson, 1962 a; Rilbe, 1971), т. е. хорошей электропроводностью обладают амфолиты с малыми значениями $pI—pK_1$. Аналогичная закономерность наблюдается и для буферной емкости амфолитов. Таким образом, значение параметра $(pI—pK_1)$ является наиболее существенным критерием при выборе хороших амфолитов-носителей.

Как видно из рис. 1.8, глицин находится в изоэлектрическом состоянии в широком диапазоне pH, от 4 до 8 ($\Delta pK=7{,}4$, и степень ионизации в изопротонном состоянии $\alpha=0{,}00038$), т. е является плохим амфолитом-носителем. В то же время гистидин, лизин и глутаминовая кислота обладают четкими изоэлектрическими точками (разность $pI—pK_1$ мала) и соответственно проявляют свойства хороших амфолитов-носителей.

Буферная емкость и электропроводность в изоэлектрическом состоянии всегда взаимосвязаны. Это две важнейшие характеристики соединений, которые могут быть использованы в качестве амфолитов-носителей для ИЭФ (Svensson, 1962 a; см. также разд. 1.1).

1.5.6. Принцип монотонного изменения pH

Естественный градиент pH, формируемый непосредственно электрическим током, характеризуется монотонным возрастанием pH на всем пути от анода к катоду (Svensson, 1967). Обращение градиента в какой-либо точке между электродами несов-

местимо с представлением о стационарности. Это означает, что при стационарном электролизе полное разделение двух амфолитов возможно лишь тогда, когда в системе присутствует третий амфолит с промежуточным значением pI. Так, для полного разделения Asp (pI 2,8) и Glu (pI 3,2) между зонами этих амфолитов должна располагаться зона чистой воды (pI 7), что противоречит принципу монотонности pH. Таким образом, в отсутствие промежуточного амфолита гауссовы распределения этих аминокислот в стационарном состоянии будут перекрываться.

В идеальном случае амфолиты для ИЭФ должны быть равномерно распределены по всему диапазону pH. Для предотвращения образования зоны чистой воды особенно важно располагать соответствующими амфолитами для нейтральной области pH. Образование зоны чистой воды в фокусировочной колонке опасно в первую очередь из-за локального разогрева. Расчетная электропроводность воды (при 0 °С) составляет

$$\chi_W = 1{,}8 \cdot 10^{-8}\ \text{Ом}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}.$$

Напряженность поля в колонке равна

$$E = I/\chi,$$

а джоулево тепло, выделяющееся в единице объема,

$$q = I^2/\chi,$$

где I — плотность тока, χ — электропроводность. Даже при очень низком значении $I = 10^{-4}$ А/см^2 падение напряжения в воде будет достигать 10 000 В/см, а выделяющееся тепло — 1 Вт/см^3. Почти все падение напряжения будет приходиться на одну только зону чистой воды, что ухудшит фокусирование соседних амфолитов и приведет к их диффузии. Это в свою очередь может привести к увеличению первоначальных размеров зоны чистой воды. Теоретически в соответствии с принципом монотонности вода может образовывать зону с нейтральным pH, так как она является амфолитом и при pH 7 находится в изоэлектрическом состоянии. Соответствующие катионы (H_3O^+) отталкиваются от анода, а анионы (OH^-) — от катода, и в целом вода стремится сконцентрироваться при pH 7. Тем не менее вода — очень плохой амфолит-носитель с крайне малыми буферной емкостью и электропроводностью при pH=pI. Таким образом, присутствие каких-либо других амфолитов в нейтральной области pH совершенно необходимо.

1.5.7. Разрешающая способность

Как правило, белки фокусируются в виде очень узких зон, т. е. в пределах достаточно узкого интервала значений pH. Внутри такого интервала градиент pH и зависимость электро-

форетической подвижности от pH можно считать линейными, а соответствующие значения d(pH)/dx и du/d(pH) — постоянными. Если направить ось x вдоль направления электрического тока, то градиент pH будет положительной величиной, а производная подвижности — отрицательной. Тогда величина p, определяемая как

$$p = -\frac{du}{dx} = -\frac{du}{d(pH)}\,\frac{d(pH)}{dx}, \qquad (17)$$

будет положительна и, поскольку $u=0$ при $x=0$, зависимость между u и x примет вид $u=-px$. Подставив это выражение в уравнение (3), получим

$$dC/C = -(pE/D)\,x dx. \qquad (18)$$

Если считать, что внутри сфокусированной зоны значения E и D также постоянны, это уравнение будет иметь следующее решение:

$$C = C_0 \exp(-pEx^2/2D). \qquad (19)$$

Физический смысл константы интегрирования C_0 состоит в том, что она равна максимальной локальной концентрации белка в зоне его pI. Функция (19) представляет собой гауссово распределение концентрации белка с точками перегиба

$$\sigma = \pm\sqrt{D/pE}. \qquad (20)$$

Подставляя сюда выражение (17) для коэффициента пропорциональности p, получаем

$$\sigma = \pm\sqrt{DE^{-1}[-du/d(pH)]^{-1}[d(pH)/dx]^{-1}}. \qquad (21)$$

Если расстояние между максимумами двух соседних зон с одинаковой загрузкой в три раза превышает расстояние между максимумом и точкой перегиба внутри зоны, то зоны будут отделены друг от друга четким концентрационным минимумом. Этот критерий был взят за основу при выводе уравнения, описывающего условия количественного разрешения двух максимально близких зон (Rilbe, 1973 a):

$$\Delta pH = \Delta x\,[d(pH)/dx] = 3\sigma\,[d(pH)/dx]. \qquad (22)$$

Подставляя сюда выражение (21), получаем для pH=pI:

$$\Delta pI = 3\sqrt{\frac{D\,[d(pH)/dx]}{E\,[-du/d(pH)]}}. \qquad (23)$$

Соотношение (23) показывает, что хорошее разрешение может быть получено для веществ с низким коэффициентом диффузии и достаточно большим значением производной [du/d(pH)] в

изоэлектрической точке. Этим требованиям удовлетворяют практически все белки. Хорошему разрешению способствуют высокая напряженность поля и плавный градиент pH. Зная форму градиента, т. е. величину $[d(pH)/dx]$, и значение σ, которое определяется по ширине зоны на участке с ординатой, равной $e^{-1/2}$ (т. е. на уровне 0,61 от высоты пика), можно оценить численное значение ΔpH. Подобные расчеты показывают, что разрешающая способность ИЭФ позволяет разделять молекулы, изоточки которых различаются между собой лишь на 0,02 единицы pH (Vesterberg, Svensson, 1966).

Похожее уравнение для разрешающей способности (R_S) ИЭФ было выведено в работе Giddings, Dahlgren, 1971:

$$R_S = \frac{\Delta pH}{4} \sqrt{\frac{-FE\,[dq/d\,(pH)]}{RT\,[d\,(pH)/dx]}}. \qquad (24)$$

Здесь F — постоянная Фарадея (96 500 Кл), E — напряженность электрического поля, R — газовая постоянная, T — абсолютная температура, q — эффективный заряд частиц, x — пройденный путь.

1.5.8. Вместимость по числу пиков

В работе Giddings, Dahlgren, 1971, было введено понятие «вместимости по числу пиков» (peak capacity) — максимального числа компонентов, которые могут быть разделены при помощи данного метода в данных экспериментальных условиях. Для метода ИЭФ эта величина определяется как

$$n = \sqrt{\frac{-FE\,[dq/d\,(pH)]\,[d\,(pH)/dx]\,L^2}{16RT}}, \qquad (25)$$

где L — общая длина пути. Эта формула показывает, что вместимость по числу пиков для данной колонки возрастает пропорционально длине пути и квадратному корню из произведения параметров, характеризующих крутизну градиента и зависимость подвижности белка от pH. В другом виде это уравнение можно записать, заменив произведение $[d(pH)/dx] \cdot L$ величиной полного инкремента pH, т. е. $pH_L—pH_0$. Это соответствует неискаженному линейному градиенту pH, когда $d(pH)/dx$ — константа. Тогда

$$n = \sqrt{\frac{-FE\,[dq/d\,(pH)]\,(pH_L - pH_0)\cdot L}{16RT}}. \qquad (26)$$

Таким образом, n прямо пропорционально квадратному корню из произведения напряженности поля на длину пути и на величину полного инкремента pH. Эти параметры можно изменять одновременно или по отдельности, в зависимости от конкретной

задачи. Например, недавно было описано ИЭФ в трубках полиакриламидного геля длиной 60 см (Rapaport, 1980). Вместимость по числу пиков и разрешающая способность в этом опыте оказались заметно выше, чем при ИЭФ в гелях обычной длины (10—12 см). Однако работа с подобными длинными тонкими цилиндрическими гелями — полимеризация, окрашивание, отмывание фона и т. п. — несомненно значительно усложняется.

1.5.9. Предельная загрузка белковой зоны

В работе Rilbe, Pettersson, 1975, ограничение, накладываемое на содержание белка в зоне при ИЭФ, выражалось следующим неравенством:

$$m < 5q\sigma^2 (\mathrm{d}c/\mathrm{d}x), \quad (27)$$

где q — площадь поперечного сечения разделительной колонки, σ — расстояние до точек перегиба на кривой гауссова распределения концентрации белка в зоне, $\mathrm{d}c/\mathrm{d}x$ — градиент концентрации сахарозы по длине колонки. Если ввести дополнительно параметры: V — объем колонки, H — высоту колонки и r — ширину зоны, которую мы принимаем равной 2σ в относительных единицах длины колонки, т. е.

$$r = 2\sigma/H \quad \text{и} \quad \sigma = rH/2, \quad (28)$$

то неравенство (27) можно переписать в виде

$$m < 1{,}25VHr^2 (\mathrm{d}c/\mathrm{d}x). \quad (29)$$

Допустив, что концентрация сахарозы растет линейно, например, от 0 до 0,5 г/см^3, можно выразить $\mathrm{d}c/\mathrm{d}x$ в численном виде:

$$\mathrm{d}c/\mathrm{d}x = \left(\frac{1}{2H}\right) \text{г/см}^3. \quad (30)$$

Подставив это значение в неравенство (29), получим

$$m < 0{,}625Vr^2 \ (\text{г/см}^3). \quad (31)$$

Для колонки объемом 100 см^3

$$m < 62{,}5r^2 \ \text{грамм}. \quad (32)$$

Таким образом, максимально допустимая загрузка белковой зоны растет пропорционально квадрату ширины зоны. Так, в случае колонки высотой 25 см из выражения (32) получаем, что для зоны шириной 1 мм загрузка должна быть не более 1 мг. Но если в той же самой колонке ширина зоны достигает 1/10 полной длины пути, то содержание белка в этой зоне может быть увеличено до 625 мг. При увеличении ширины зоны еще в 2 раза загрузку можно довести до 2,5 г белка.

Объединив уравнения (20), (17), (23) и (27), можно связать предельную загрузку белковой зоны с разрешающей способностью:

$$m < \frac{45qD^2\,(\mathrm{d}c/\mathrm{d}x)}{E^2\,(\Delta\mathrm{pI})^2\,[\mathrm{d}u/\mathrm{d}\,(\mathrm{pH})]^2}. \qquad (33)$$

Следовательно, рабочая емкость колонки растет пропорционально квадрату разрешающей способности для данного набора белковых компонентов. Это означает, что подбор градиента pH, обеспечивающего более высокую степень очистки белковых фракций, одновременно позволяет увеличить содержание белка во фракциях. В этом смысле ИЭФ имеет очевидные преимущества по сравнению с другими методами разделения, для которых высокий выход вещества, как правило, достигается за счет ухудшения его очистки, и наоборот.

До настоящего времени не было предложено ни одного уравнения для расчета предельной загрузки белковых зон при ИЭФ в гелях. Экспериментальным путем было найдено, что при ИЭФ в слое сефадекса максимальная загрузка по белку достигает 10—12 мг/мл (Radola, 1975). В этих опытах загрузка определялась количеством белка (в мг), содержащегося в 1 мл суспензии сефадекса, непосредственно используемой для приготовления слоя. В слое гранулированного геля размером 10×200×400 мм (общий объем 800 мл) в градиенте pH 3—10 за один опыт удавалось успешно фракционировать белки из 10 г проназы E. По качеству разделения данная система не уступала аналитическим вариантам ИЭФ. При такой загрузке полупрозрачные зоны сфокусированных белков видны в слое геля невооруженным глазом. Приведенная выше оценка величины предельной загрузки получена при ИЭФ в широком градиенте pH (3—10). Теоретически при работе в более узких градиентах pH содержание белка может быть значительно увеличено [см. неравенство (33)]. Таким образом, одно из важнейших преимуществ, которое дает использование геля в качестве поддерживающей среды для ИЭФ, заключается в значительной стабилизации белковых зон. Предельно допустимая загрузка при ИЭФ зависит, конечно, и от ряда других факторов — от числа разделяемых белков, от их растворимости в изоточке и т. д. В работе Chrambach, 1980, приведены эмпирические оценки величин максимальной загрузки для различных электрофоретических методов. Для электрофореза (ЭФ) в полиакриламидном геле предельно допустимое содержание белка в зоне — около 0,1 мг/см. Для ИЭФ эта величина выше на 1—2 порядка, а для изотахофореза (ИТФ) — на 2—3 порядка. Таким образом, предельно допустимая загрузка белковой зоны при ИЭФ находится в диапазоне 1—10 мг/см, при ИТФ — в диапазоне 10—100 мг/см.

Концентрация белка в зоне при фокусировании едва ли может превышать 100 мг/мл. На участке с очень высокой концентрацией белка напряжение может возрасти настолько сильно, что выделяющееся тепло вызовет денатурацию белка. Рост напряжения на таком участке будет вызван падением электропроводности, происходящим, вероятно, вследствие того, что ионы буфера и молекулы воды оказываются в значительной степени «иммобилизованы» — связаны с белком.

1.5.10. Условия образования плавного градиента pH

Если градиент pH образован небольшим числом амфолитов-носителей (от 5 до 10 различных амфолитов на единицу pH) с достаточно высокими значениями ΔpK, то характер изменения pH внутри такого градиента оказывается ступенчатым. Для того чтобы ответить на вопрос, сколько разных амфолитов-носителей необходимо для образования плавного градиента, достаточно сформулировать условие слияния двух соседних зон амфолитов в одну непрерывную зону. Как показано в работе Svensson, 1966, сумма двух одинаковых гауссовых кривых дает одну кривую с максимумом в виде широкого плато тогда, когда исходное расстояние между двумя максимумами меньше или равно удвоенному стандартному отклонению. В этом случае, т. е. при полном отсутствии разрешения между любыми соседними зонами амфолитов, следует ожидать плавного изменения pH по всему градиенту. Таким образом, максимальное различие между значениями pI примыкающих друг к другу амфолитов-носителей, удовлетворяющее сформулированному критерию, определяется неравенством

$$\Delta pI < 2\sqrt{\frac{D\,[d\,(pH)/dx\,(1+s)]}{Eu\ln 10}}. \qquad (34)$$

Это неравенство [полученное исходя из уравнения (23)] полностью согласуется с выводами, сделанными в работе Almgren, 1971. Параметр s характеризует качество амфолитов: чем меньше значение s, тем лучше электропроводность и буферная емкость. Из неравенства (34) следует, что «хорошие» амфолиты должны располагаться вдоль градиента pH теснее, чем амфолиты худшего качества. Особенно велика потребность в амфолитах с низкими значениями s и изоточками в нейтральной области pH для компенсации низкой электропроводности в зоне «фокусирования» воды. Для успешного изоэлектрофокусирования желательно одновременное присутствие как хороших, так и плохих амфолитов при повышенном содержании хороших амфолитов в нейтральной области pH (Rilbe, 1976). Применение амфолитов с высокими значениями ΔpK позволяет уменьшить число

амфолитов, необходимое для создания плавного градиента pH (Almgren, 1971). Однако если значение Δp*K* данного амфолита слишком велико, то для получения необходимых буферной емкости и электропроводности придется значительно повысить его концентрацию. В результате стационарное состояние будет достигаться намного медленнее.

Можно ли рассчитать, какое число разных амфолитов требуется для формирования плавного градиента pH? Проведение подобного расчета для реальной системы может оказаться невыполнимой задачей. Тем не менее с помощью ЭВМ удалось смоделировать и рассчитать упрощенную систему ИЭФ (Almgren, 1971). Модельная система включала гипотетический набор простейших амфолитов с одинаковой подвижностью и одинаковыми значениями коэффициента диффузии и Δp*K*. Считали, что все индивидуальные амфолиты присутствуют в равных количествах и что их изоточки равномерно распределены по всему диапазону pH. Результаты расчетов представлены графически на рис. 1.9, *А*, *Б* и *В*. Для решения задачи надо задать параметры Δp*I* и Δp*K* (в единицах pH), а также ширину кривой распределения в стационарном состоянии. Как видно из рис. 1.9, *А*, система, состоящая из восьми амфолитов со значениями Δp*K*=2 для каждого компонента и одинаковыми инкрементами Δp*I*=0,05, формирует плавный градиент в диапазоне pH от 7,0 до 7,25. Электропроводность (*H*) в этом диапазоне постоянна. Таким образом, можно считать, что для образования плавного градиента на единицу pH должно приходиться не менее 30 разных амфолитов-носителей. Следует отметить, что кривые распределения в этом примере очень широкие — любая зона пересекается с четырьмя соседними (по две с каждой стороны) зонами сфокусированных амфолитов. Для того чтобы «хорошие» амфолиты при ИЭФ могли давать достаточно широкие зоны, следует или повышать их исходную концентрацию (на рис. 1.9, *А* концентрация в пике составляет 10 м*М*), или понижать рабочее напряжение в колонке. Можно варьировать и оба этих параметра одновременно.

В аналогичной системе для амфолитов с Δp*K*=2, но с Δp*I*=0,1 на единицу pH приходится только 15 разных компонентов (рис. 1.9, *Б*). Электропроводность в такой системе постоянна, но pH изменяется ступенчато. Ступеньки (точнее, плато) располагаются в центральной части каждой зоны. В области перехода между зонами амфолитов находятся участки линейного роста pH. Превращение плавного градиента в ступенчатый связано не столько с уменьшением (вдвое) числа амфолитов на единицу pH, сколько со сжатием кривых статистического распределения для каждого компонента примерно в 3 раза по сравнению с кривыми на рис. 1.9, *А*. В результате зона любого ам-

фолита пересекается только с одной соседней зоной с каждой стороны. При этом концентрация данного амфолита в центре соседней зоны падает до нуля. Поскольку в этом примере значение Δp*K* амфолитов такое же, что и в предыдущем, то образование более узких зон вызвано снижением концентрации амфолитов (на рис. 1.9, *Б* значение в пике — 6 м*М*) или повышенным напряжением в системе.

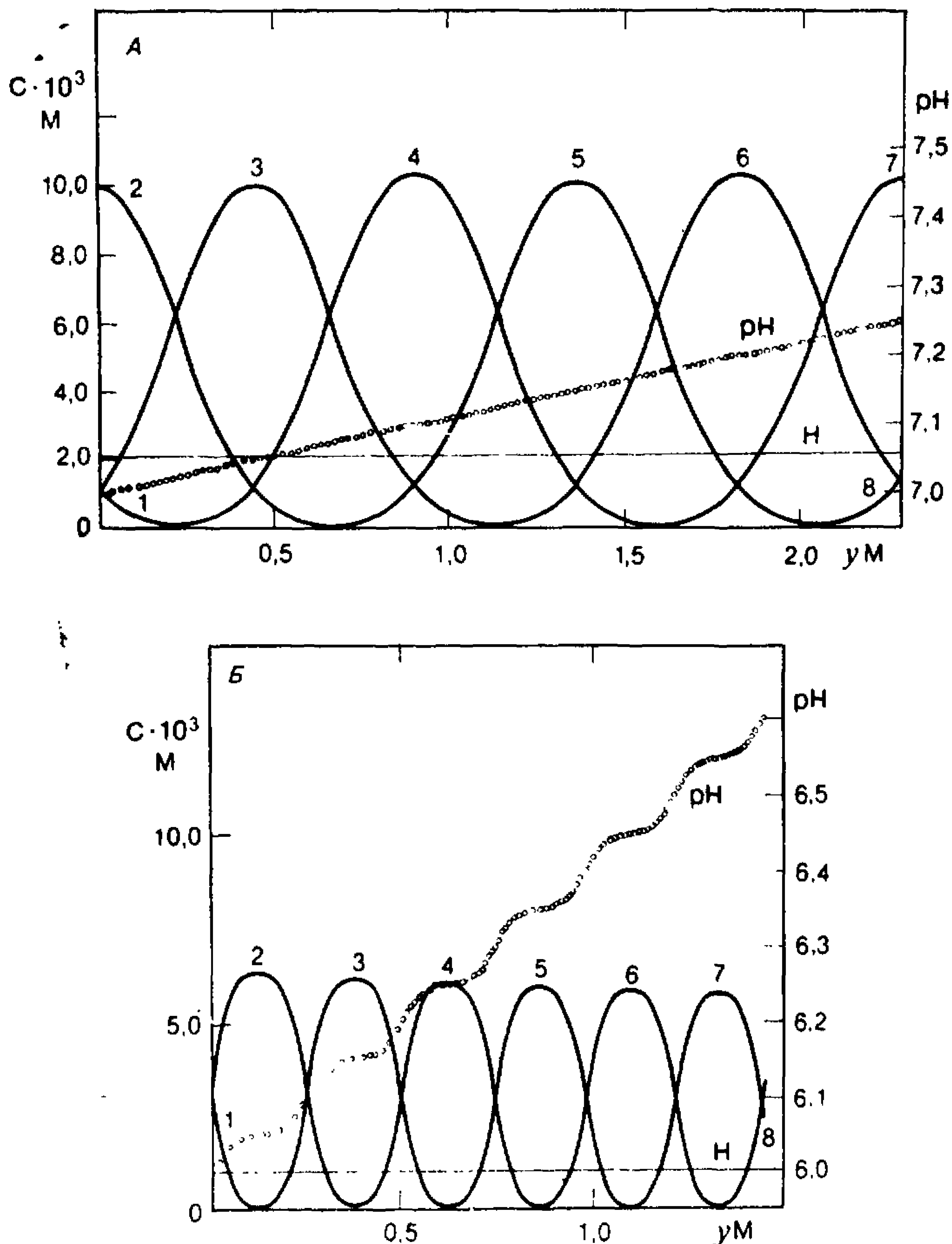
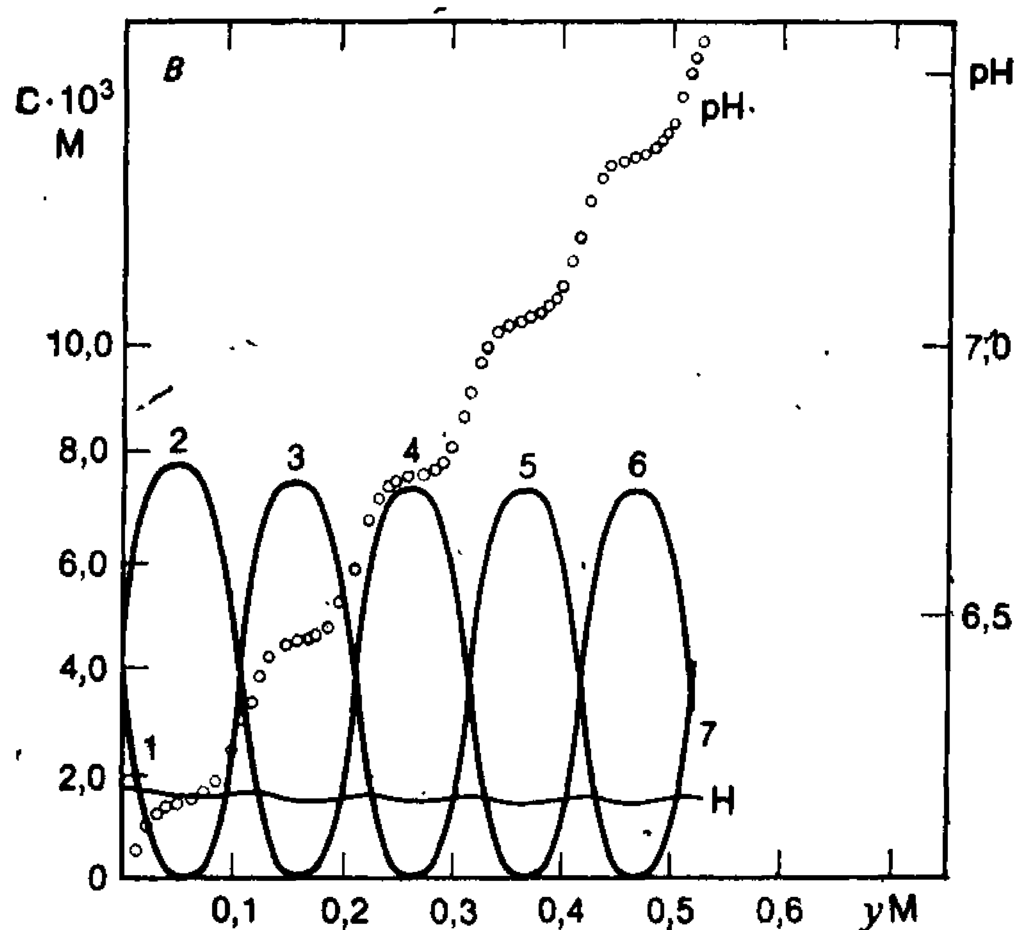


Рис. 1.9. Моделирование с помощью ЭВМ процесса фокусирования в системе двухвалентных амфолитов с одинаковыми значениями коэффициента диффузии и электрофоретической подвижности. Величины, отложенные по осям абсцисс (*y*M) и по левым осям ординат, имеют размерность моль/литр. Сплошная прямая Н — электропроводность, прерывистая линия — градиент pH. *А*. Фокусирование восьми амфолитов-носителей со значениями Δp*K*=2 и с изоточками, различающимися на Δp*I*=0,05, в диапазоне 0,25 ед. pH. *Б*. Фокусирование восьми амфолитов-носителей со значениями Δp*K*=2 и с изоточками, различающимися на Δp*I*=0,1, в диапазоне 0,5 ед. pH. *В*. Фокусирование семи амфолитов-носителей со значениями Δp*K*=4 и Δp*I*=0,3. Плавный градиент образуется только в случае *А*. (Almgren, 1971.)

В качестве третьего примера выбран неудачный во всех отношениях набор амфолитов с $\Delta pK=4$ и $\Delta pI=0{,}3$. В такой системе будет наблюдаться ступенчатое изменение pH и неравномерное распределение электропроводности (рис. 1.9, *В*). Минимумы электропроводности располагаются в центральной части каждой зоны (соответствуют плато на градиенте pH), а максимумы — на границах между зонами. Здесь, так же как на рис. 1.9, *Б*, зона каждого амфолита пересекается только со своими ближайшими соседями; при приближении к центру соседней зоны концентрация данного амфолита стремится к нулю. Образование таких зон, примерно вдвое более узких, чем в предыдущем примере, может происходить только при очень высоком напряжении, поскольку для амфолитов с $\Delta pK=4$ зависимость подвижности от pH вблизи изоточки имеет значительно более пологий характер, чем в случае хороших амфолитов.

Проведение такого теоретического анализа позволяет сделать ряд выводов, важных в практическом отношении. В первую очередь удается оценить минимальное число амфолитов-носителей, необходимое для образования плавного градиента pH, — не менее 30 на единицу pH. Кроме того, оказывается, что при очень высоком падении напряжения (фирма Pharmacia рекомендует использовать 250—300 В/см, а в работе Kinzkofer, Radola, 1981, ИЭФ проводили в мини-гелях при 400—700 В/см) существует серьезная опасность, что даже хорошие амфолиты, фокусируясь в слишком узкие зоны, не смогут обеспечить равномерного распределения электропроводности. В системе возникнут локальные минимумы электропроводности, которые могут вызывать избыточное выделение тепла и соответственно термоденатурацию лабильных белков.



1.6. Синтез амфолитов торговых марок

Теоретические основы современного ИЭФ, как нам уже известно, были разработаны в серии статей под общим названием «Изоэлектрическое фракционирование. Анализ и характеристика амфолитов, образующих естественные градиенты pH (Svensson, 1961, 1962 a, b; Rilbe, 1973 a). Однако проведенное Свенссоном тщательное изучение химических каталогов в поисках имеющихся в продаже амфолитов, пригодных для ИЭФ, т. е. обладающих хорошей проводимостью и высокой буферной емкостью вблизи изоточки ($pI—pK<1,5$), дало не очень обнадеживающие результаты. Перечень таких амфолитов приведен в табл. 1.2 (Svensson, 1962 a). При составлении этого перечня амфолиты с ($pI—pK$)>2,5 считали непригодными для ИЭФ. Соединения, для которых этот параметр находится в диапазоне от 1,5 до 2,5, были включены в список, но расценивались как плохие амфолиты-носители. Из табл. 1.2 видно, что в области pH 5—7 амфолиты, удовлетворяющие соответствующим требованиям, практически отсутствуют.

Настоящая таблица приведена главным образом для того, чтобы проиллюстрировать, насколько сложным и трудоемким (как в теоретическом, так и в практическом отношении) оказался процесс «вынашивания» метода ИЭФ. Кроме того, некоторые из перечисленных в таблице соединений используются в одной из модификаций обычного метода ИЭФ. Эта модификация была первоначально названа «разделительным ИЭФ» (Caspers et al., 1977), а затем переименована в «ИЭФ в модифицированном градиенте pH» (Beccaria et al., 1978). Сущность подхода сводится к расширению одного определенного участка на градиенте pH, образованном обычными амфолитами-носителями Вестерберга, путем добавления соответствующих амфолитов из приведенного списка. Подобные амфолиты сами по себе не подходят для ИЭФ, но при использовании в качестве дополнительных компонентов они позволяют при необходимости значительно повысить разрешение вблизи определенных значений pH (см. также разд. 4.1.1).

Исследования, отраженные в табл. 1.2, проводились в Химической лаборатории Гейтса и Креллина, в Калифорнийском Технологическом институте, в лаборатории Л. Полинга. По возвращении в Стокгольм Свенссон продолжил поиски в другом направлении. Было решено, что в качестве амфолитов, пригодных для разделения белков методом ИЭФ, могут быть использованы короткие пептиды. Поначалу применялся казеиновый гидролизат (Svensson, 1962 b), затем предпочтение было отдано гидролизату гемоглобина или суммарного белка крови ввиду повышенного содержания гистидина в гемоглобине. После

Таблица 1. 2. Потенциальные амфолиты-носители для ИЭФ (расположены в порядке возрастания pI) (Svensson, 1962a)

Амфолит	pI	pI—pK_1
Аспарагиновая кислота	2,77	0,89
Глутатион	2,82	0,70
Аспартилтирозин	2,85	0,72
о-Аминофениларсоновая кислота	3,00 (?)	0,77 (?)
Аспартиласпарагиновая кислота	3,04	0,34
п-Аминофениларсоновая кислота	3,15 (?)	0,92 (?)
Пиколиновая кислота	3,16	2,15
L-глутаминовая кислота	3,22	1,03
β-Гидроксиглутаминовая кислота	3,29	0,96
Аспартилглицин	3,31	1,21
Изоникотиновая кислота	3,35	1,51
Никотиновая кислота	3,44	1,37
Антраниловая кислота	3,51	1,47
п-Аминобензойная кислота	3,62	1,30
Глициласпарагиновая кислота	3,63	0,82
м-Аминобензойная кислота	3,93	0,81
Дийодтирозин	4,29	2,17
Цистинилдиглицин	4,74	1,62
α-Гидроксиаспарагиновая кислота	4,74	2,43
α-Аспартилгистидин	4,92	1,90
β-Аспартилгистидин	4,94	2,00
Цистеинилцистеин	4,96	2,31
Пентаглицин	5,32	2,27
Тетраглицин	5,40	2,35
Триглицин	5,59	2,33
Тирозилтирозин	5,60	2,08
Изоглутамин	5,85	2,04
Лизилглутаминовая кислота	6,10	1,65
Гистидилглицин	6,81	1,00
Гистидилгистидин	7,30	0,50
Гистидин	7,47	1,50
L-метилгистидин	7,67	1,19
Карнозин	8,17	1,34
α,β-Диаминопропионовая кислота	8,20	1,40
Ансерин (метилкарнозин)	8,27	1,23
Тирозиларгинин	8,38 (?)	1,00 (?)
	8,68 (?)	1,13 (?)
L-орнитин	9,70	1,05
Лизин	9,74	0,79
Лизиллизин	10,04	0,59
Аргинин	10,76	1,72

протеолиза смесь пептидов обессоливали и фракционировали при помощи стационарного электролиза в 20-камерном аппарате. Применение полученных таким образом препаратов для ИЭФ позволяло разделять белки, изоточки которых различались на 0,1 ед. pH (Vesterberg, Svensson, 1966). Однако и этот подход был не лишен недостатков. Пептидные препараты были окрашены, а кроме того, фракции олигопептидов, фокусирующихся при pH 5,0—6,5, проявляли свойства плохих амфолитов-носителей.

Переломным моментом в истории ИЭФ можно считать 26 августа 1964 г., когда Олаф Альфред Ингве Вестерберг (для друзей — просто Олаф) оформил шведский патент на способ синтеза амфолитов-носителей для ИЭФ. (Более доступный англоязычный вариант описания изобретения можно найти в американском патенте № 3485736, выданном 23 декабря 1969 г.). Только с этого момента начинается период подлинного расцвета метода ИЭФ.

1.6.1. Синтез амфолинов (фирма LKB)

Основные данные по этой теме содержатся в работах Vesterberg, 1969 a, b; Haglund, 1975; Davies, 1970, и Gasparic, Rosengren, 1974, 1975. Несмотря на то что прямо это никем не отмечалось, ясно, что имеющиеся в продаже амфолины — это и есть амфолиты-носители, впервые синтезированные и запатентованные Вестербергом. Как об этом сказано в патенте, амфолины представляют собой «полиаминополикарбоновые кислоты; каждая из них содержит не менее четырех слабых протолитических групп, в том числе по крайней мере одну карбоксильную группу и одну замещенную аминогруппу. Эти соединения не содержат пептидных связей».

Каким же образом Вестербергу удалось разработать столь совершенную — даже по сегодняшним меркам — и вместе с тем простую систему? Направление поиска задавала теория Свенссона: значения pI, а следовательно, и значения p*K* амфолитов-носителей должны быть равномерно распределены по всему диапазону pH 3—10. В алифатических соединениях, содержащих только одну карбоксильную группу или одну аминогруппу, диссоциация этих групп происходит, как правило, при pH 4—5 и pH 9—10 соответственно. Однако олиго- и полиамины, особенно такие, в которых все аминогруппы разделены этиленовыми звеньями, характеризуются целым набором значений p*K*. При этом оказывается, что, чем больше аминогрупп содержится в олигоамине, тем шире спектр соответствующих значений p*K* (см. табл. 1.3). Показано, что в высшем из доступных на сегодня олигоаминов такого типа — пентаэтилен-

Таблица 1.3. Константы диссоциации этиленаминов[1)]

Амины	pK_1	pK_2	pK_3	pK_4	pK_5	Т, °С
Этилендиамин	10,1	7,0				20
Диэтилентриамин	9,9	9,1	4,3			20
Триэтилентетрамин	9,9	9,2	6,7	3,3		20
Тетраэтиленпентамин	9,9	9,1	7,9	4,3	2,7	25

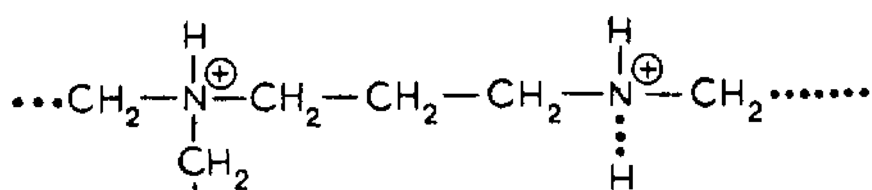
[1)] Vesterberg, 1969b.

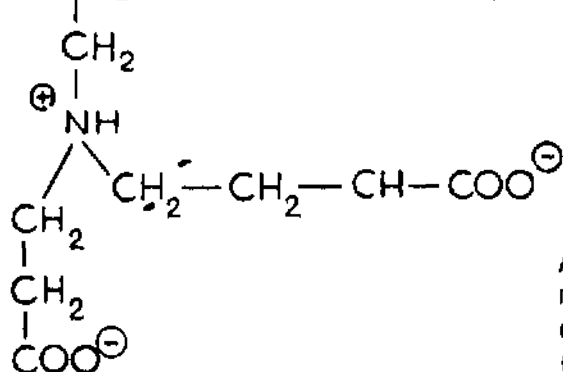
гексамине (ПЭГА) — значение pK_6 приближается к 1,1 (Righetti et al., 1975a).

Исходя из этого, Вестерберг сделал вывод, что подходящие амфолиты-носители могут быть получены на основе таких олигоаминов, как этилендиамин, диэтилентриамин, триэтилентетрамин (ТЭТА), тетраэтиленпентамин (ТЭПА), ПЭГА и их смесей. В качестве присоединяемого карбоксильного компонента он использовал α, β-ненасыщенные карбоновые кислоты, преимущественно содержащие не более 10 атомов углерода в цепи. Помимо одноосновных кислот — акриловой, метакриловой и кротоновой — было предложено использовать и дикарбоновые ненасыщенные кислоты, например малеиновую или итаконовую. Синтез можно проводить, исходя из индивидуальных кислот или из их смесей. Имеющиеся в продаже амфолины, по-видимому, содержат производные только одной, акриловой, кислоты.

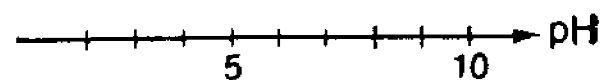
Способ синтеза основан на методике, предложенной еще в работе Engel, 1888. К смеси полиаминов (желательно содержащей в основном ПЭГА) постепенно добавляют акриловую кислоту (обычно из расчета 1 карбоксильная группа на 2 атома азота). Реакцию проводят при 70 °С до полного исчезновения акриловой кислоты, как правило не менее 5 часов. С выходом около 100% получают смесь амфолитов с набором значений p*I* и p*K*, равномерно и с большой плотностью распределенных по всему диапазону pH 3—10. Синтез идет по механизму реакции Михаэля, т. е. с присоединением против правила Марковникова и образованием производных β-аминокислот (в данном случае — β-аминопропионовой кислоты). На рис. 1.10 в общем виде представлена гипотетическая структура амфолитов этого типа. Приведены также данные о поступающих в продажу наборах амфолитов для проведения ИЭФ в узких интервалах pH. Фракции амфолитов с узким диапазоном pH, за исключением крайних областей pH 2,5—4 и 9—11, получают фракционированием исходной смеси в многокамерном электролизере.

AMPHOLINE® – амфолиты-носители





Алифатические полиамино-поликарбоновые кислоты



3,5–10

5–8

2,5-4 4-6 6-8 8-9,5

3,5-5 5-7 7-9 9-11

4-6 8-9,5 9-11 5-7 8-11 4-7

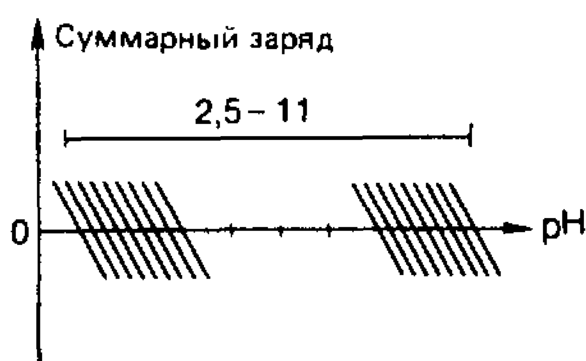


Рис. 1.10. Строение и состав амфолинов. *Вверху слева* приведена типичная структурная формула (алифатическая олигоамино-олигокарбоновая кислота). *Внизу слева* изображены фрагменты гипотетических кривых титрования набора амфолинов. *Справа* — наборы амфолинов с узким и широким диапазонами pH. (С любезного разрешения LKB Produkter AB.)

Диапазон, в котором синтезированные таким способом амфолиты проявляют буферные свойства, ограничен областью pH 3,5—10, поскольку они практически не содержат функциональных групп со значениями р*K* вне указанных пределов. Впоследствии Вестербергу удалось разработать методики, позволившие расширить рабочий диапазон pH фракционирования (Vesterberg, 1973с, d). Амфолиты, содержащие гуанидиновые группы, несмотря на высокие значения pI, оказались непригодными ввиду их нестабильности в щелочной среде. Было обнаружено, что алифатические олигоамины, у которых атомы азота в цепи разделены более чем тремя метиленовыми звеньями, характеризуются большими значениями р*K*, чем такие соединения, как ТЭТА, ТЭПА или ПЭГА. Соответственно присоединение карбоксильных групп к олигоаминам этого типа позволяет получить амфолиты с более высокими значениями pI (Vesterberg, 1976). Так, у 1,6-диаминогексана $pK_1=10{,}6$ и $pK_2=11{,}7$, а у его карбоксилированного производного pI = 11,15 (все значения определены при 4 °C). Гомологичные диамины — 1,4-диаминобутан и 1,5-диаминопентан — обладают сходными свойствами. Таким образом, амфолины диапазона pH 9—11, вероятно, содержат на-

бор карбоксилированных олигоаминов указанного типа. Аналогичный подход может быть использован для синтеза амфолитов с рабочим диапазоном pH 2,5—4. В этом случае задача сводится к нахождению подходящих более сильных кислых функциональных групп. Так, Вестерберг предложил использовать производные некоторых дикарбоновых кислот, у которых благодаря взаимному влиянию карбоксильных групп значения pK_1 заметно ниже, а pK_2 выше, чем у обычных монокарбоновых кислот (Vesterberg, 1976). Например, для малоновой кислоты ($HOOC—CH_2—COOH$) $pK_1=1,8$, а $pK_2=5,7$.

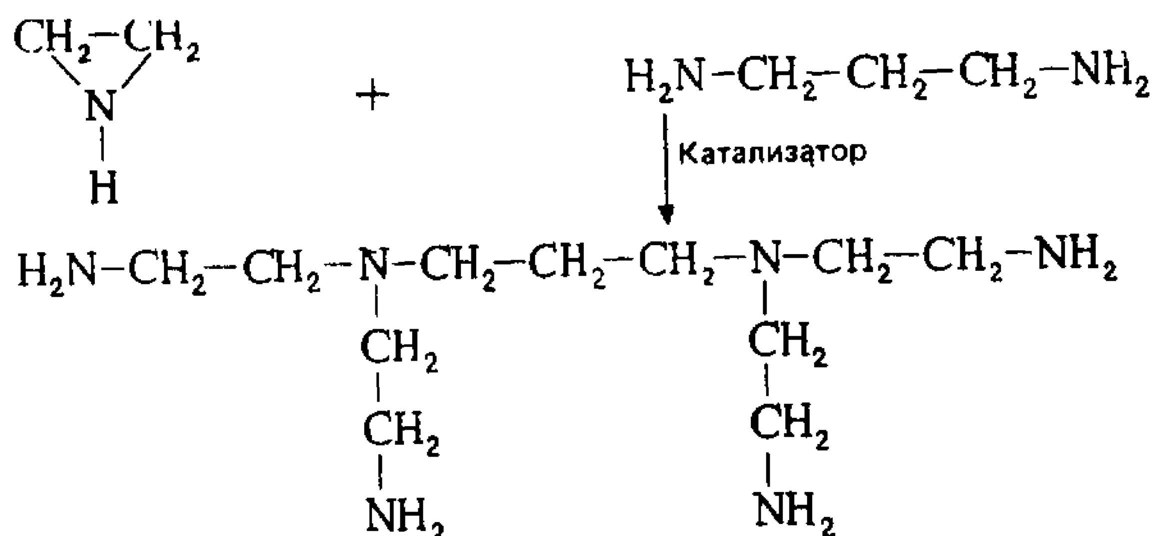
Амфолины обычно поступают в продажу в виде 40%-ных растворов, расфасованных по 25-мл флаконам в стерильной упаковке. Исключение составляют амфолины крайних диапазонов pH: 2,5—4 и 9—11, которые обладают вдвое более высокой электропроводностью и буферной емкостью и поэтому поставляются в виде 20%-ных растворов. Физико-химические свойства этих амфолинов свидетельствуют о том, что они не относятся к тому же «семейству», что и обычные амфолиты Вестерберга, которые синтезируются в виде смеси с набором изоточек в диапазоне 3,5—10, а затем разделяются на фракции с более узким рабочим диапазоном pH (Gelsema et al., 1979; Bianchi Bosisio et al., 1981). Несмотря на то, что со стороны фирмы-изготовителя соответствующие сведения не поступали, можно полагать, что амфолины с диапазонами pH 2,5—4 и 9—11 синтезируются отдельно на основе специфических наборов олигоаминов и кислот.

В работе Davies, 1970, утверждается, что в амфолинах фирмы LKB область кислых pH «усилена» путем добавления глутаминовой и аспарагиновой кислот, а щелочная область — за счет лизина и аргинина, в связи с тем что в ходе синтеза выход амфолитов для крайних областей pH значительно ниже, чем для диапазонов, примыкающих к нейтральному pH. Присутствие свободных аминокислот было непосредственно обнаружено в работе Earland, Ramsden, 1969. На основании изучения спектров дисперсии оптического вращения растворов амфолинов аналогичное предположение было высказано также в работе Righetti et al., 1975 b. Однако, по данным Haglund, 1975, аминокислоты содержались в амфолинах, выпускавшихся с 1967 по 1972 г. Начиная с 1973 г. аминокислоты были исключены из состава поступающих в продажу препаратов. Одно время (в основном в 1974—1975 гг.) фирма LKB поставляла [^{14}C]-меченые амфолины для изучения адсорбционных эффектов, а также наборы низкомолекулярных амфолитов-носителей для препаративного разделения пептидов (Gasparic, Rosengren, 1974). К сожалению, насколько мне известно, эти продукты уже перешли в разряд «раритетов». Примерно в то же время LKB выпускала

амфолины с очень узким рабочим диапазоном pH (охватывающим всего 0,5 ед. pH вместо обычных 2 ед. pH), например с pH разделения 7,0—7,5 для фракционирования гемоглобинов или с pH 4,0—4,5 — для разделения генетических вариантов α_1-антитрипсина. В настоящее время и этот вид продукции перестал поступать в продажу.

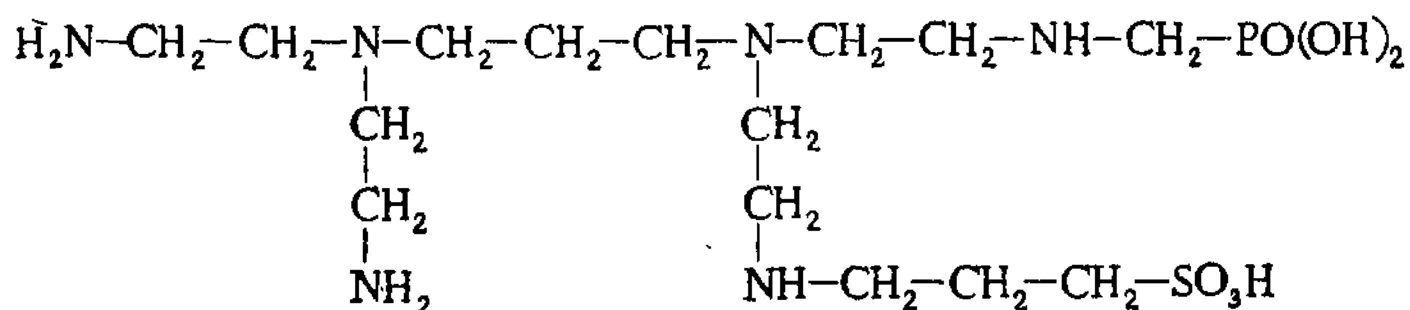
1.6.2. Синтез сервалитов (фирма Serva)

Получение и свойства этих амфолитов описано в работах Pogacar, Jarecki, 1974, и Grubhofer, Borja, 1977. Изначально для синтеза использовали олигоамины ТЭПА и ПЭГА, а также низкомолекулярные полиэтиленимины. Затем смесь полиаминов стали получать сополимеризацией этиленимина и пропилендиамина с последующей очисткой от компонентов с мол. массой больше 400. Ход реакции можно проиллюстрировать следующей схемой:



В качестве кислых групп использовали остатки серной и фосфорной кислот, для введения которых применяли пропансультон[1] или Na-винилсульфонат и Na-хлорметилфосфонат.

Ниже показана типичная структура сервалитов:



Оптимальных результатов при синтезе статистического набора полиамино-полисульфокислот удается достичь с использованием пропансультона в щелочной среде. В этих условиях происходит интенсивное алкилирование первичных, вторичных и третичных аминогрупп (в последнем случае получаются производные бетаинового типа). Однако полученные таким образом

[1] Внутренний сложный эфир (γ-сультон) 3-гидрокси-1-пропансульфокислоты. — *Прим. перев.*

амфолиты характеризуются набором значений pI 2—3,5 и 5,8—9,5 и практически не содержат компонентов в промежуточной области pH 3,5—5,8. Этот пробел не удается заполнить даже с помощью предварительной кватернизации аминогрупп диметилсульфатом, повышающей их основность. Получение амфолитов со значениями pI в диапазоне pH 3,5—5,8 оказалось возможным только благодаря дополнительному введению слабых кислотных карбоксильных функций с помощью акриловой кислоты.

Таким образом, сервалиты представляют собой полиамины различной структуры, содержащие карбоксильные, фосфатные и сульфогруппы. Сервалиты (которые поставляются также фирмой Bio Rad под названием «биолиты») поступают в продажу в виде наборов с рабочими диапазонами pH 2—4, 3—5, 4—6, 5—7, 6—8, 7—9, 8—10, 9—11, а также с широким диапазоном pH 2—11. Как и амфолины, почти все они поставляются в виде 40%-ных растворов в 25-мл стерильных флаконах. Сервалиты с pI 2—4, 3—5 и 9—11 выпускаются в виде 20%-ных растворов. Фирма Serva предлагает также технический препарат для работы в области pH 3—10. Этот препарат имеет интенсивную желто-коричневую окраску, но по своим рабочим характеристикам при ИЭФ не уступает очищенным бесцветным препаратам, а сто́ит при этом значительно дешевле.

Амфолиты с узким диапазоном pI получают изоэлектрическим фракционированием исходной смеси, содержащей полный набор компонентов со значениями pI, распределенными по всей доступной области pH. Так, фракционирование смеси амфолитов pH 2—11 достигалось 20-часовым ИЭФ 2%-ного раствора в 60-л камере, разделенной на 21 отсек пористыми керамическими перегородками (Grubhofer, Borja, 1977).

1.6.3. Синтез фармалитов (фирма Pharmacia)

Летом 1978 г. под фирменным названием «Фармалиты» в продажу поступили амфолиты-носители — представители нового «поколения» амфолитов Сёдерберга (Williams, Söderberg, 1979; Söderberg et al., 1980). На рис. 1.11 показана гипотетическая структура типичного амфолита, входящего в состав фармалитов и содержащего семь аминогрупп. Первый этап синтеза фармалитов — это сополимеризация аминов, аминокислот и дипептидов с эпихлоргидрином. Выбирая соответствующим образом состав исходной смеси аминов и аминокислот, удается прямо получить серии амфолитов в пяти различных узких диапазонах pI. Фармалиты pH 3—10 получают, смешивая фармалиты пяти узких диапазонов pH. Тем самым совершается операция, как бы обратная традиционной методике фракционирования

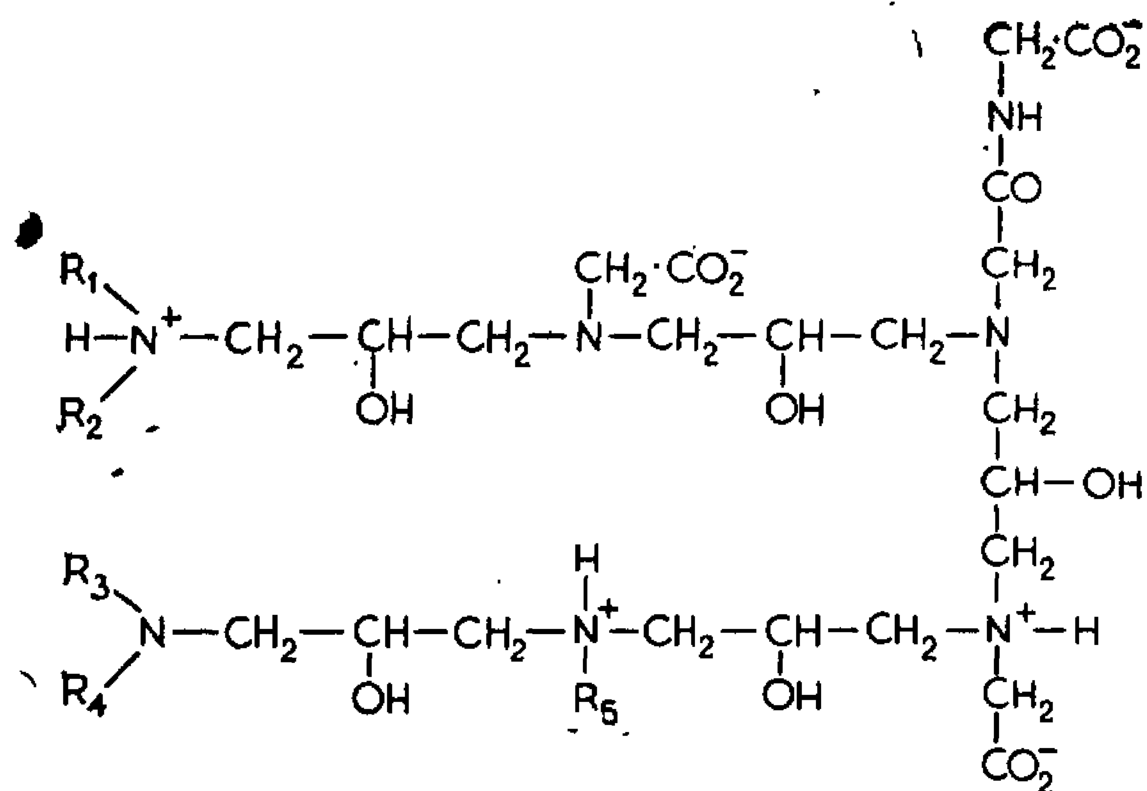


Рис. 1.11. Гипотетическая структура одного из компонентов фармалитов, содержащего 6 аминогрупп. R — гидрофильные боковые группы. (Williams, Söderberg, 1979.)

амфолитов-носителей. По утверждению фирмы, поступающие в продажу фармалиты характеризуются равномерным распределением буферной емкости и столь же равномерным распределением электропроводности на достаточно низком уровне по всему градиенту pH. Независимым образом это подтверждается в работе Gelsema et al., 1979.

Равномерного распределения электропроводности и буферной емкости при ИЭФ можно добиться, только располагая крайне гетерогенным набором синтетических амфолитов-носителей с близкими значениями p*K* и pI, распределенными с очень высокой частотой по всему рабочему диапазону pH. Поскольку при синтезе фармалитов с узким диапазоном pI используется смесь семи разных аминов, а продукты сополимеризации с эпихлоргидрином содержат в среднем по шесть аминогрупп, в результате, как подсказывает логика, может быть получен довольно ограниченный набор различных амфолитов. Однако этот набор может быть расширен при использовании в качестве исходных компонентов стереоизомеров. Так, применение D, L-эпихлоргидрина, D, L-аминов и D, L-аминокислот позволяет значительно увеличить возможное число комбинаций.

Полученные диастереомеры, в отличие от энантиомеров, проявляют заметные (пусть и не очень большие) различия в значениях pH. В действительности разнообразие молекулярных форм возрастает также за счет дополнительного образования пента- и гексамеров, а также разветвленных и циклических производных. По некоторым оценкам, фармалиты содержат около 1000 различных компонентов на единицу pH. Поскольку амфо-

литы-носители Вестерберга содержали лишь около 100 компонентов на единицу pH (Radola et al., 1977), появление амфолитов нового типа означает увеличение степени гетерогенности в популяции не менее чем на порядок.

В структуре фармалитов преобладают третичные аминогруппы, как правило соседствующие с β-гидроксильными группами. Исходя из степени полимеризации (6 остатков аминов и 5 остатков эпихлоргидрина), можно сделать вывод, что их мол. масса (M_r) должна достигать 750—800. Это заметно выше, чем значение M_r, полученное на основании данных гель-фильтрации (около 450 дальтон). Несмотря на значительную молекулярную массу, фармалиты имеют довольно компактную пространственную структуру, по-видимому за счет образования внутримолекулярных водородных связей. Основными типами буферных групп фармалитов являются: α-аминокарбоксильные группы (pH 2—3), остатки диглицина (pH 3—4), β-гидроксиэтиламиногруппы (pH 4—9) и диалкиламинопропильные группы (pH 9—11).

1.7. Синтез амфолитов-носителей в лаборатории

Итак, на сегодняшний день в продажу поступают в основном амфолиты-носители трех типов: амфолины фирмы LKB, сервалиты фирмы Serva и фармалиты фирмы Pharmacia. Несмотря на определенные химические различия между этими амфолитами, в основе методов их получения лежит все тот же принцип Вестерберга. В качестве исходных компонентов используют полиамины (или полиаминокислоты), а также органические и (или) неорганические кислоты. Синтез проводят таким образом, чтобы получить максимально гетерогенную смесь амфолитов. Для выделения фракций с узким рабочим диапазоном pH эту смесь в дальнейшем подвергают ИЭФ. Различные наборы амфолитов с узким диапазоном pI можно получить и непосредственно, подбирая соответствующие исходные вещества и условия синтеза.

Одновременно с тем, как конкурирующие фирмы стремились повысить качество выпускаемой ими продукции, ученые направляли свои усилия на поиски оптимальных методов получения амфолитов-носителей. Эти поиски оказались весьма успешными еще и потому, что в отличие от фирм-конкурентов, не раскрывающих технологических деталей своего производства, ученые стремятся как можно шире обсуждать и распространять сведения, которыми они располагают.

Благодаря исследованиям, проводившимся в течение ряда лет в различных научных лабораториях, удалось разработать новые эффективные методы получения амфолитов для ИЭФ. Новые варианты синтеза по-прежнему основаны на принципе

Вестерберга, и все же можно с уверенностью сказать, что сегодня наши знания в области химии амфолитов стали значительно шире.

1.7.1. Метод Виноградова — Ригетти

В работе Vinogradov et al., 1973, было показано, что методику Вестерберга можно воспроизвести с помощью обычного лабораторного оборудования. Присоединением остатка акриловой кислоты к ПЭГА были получены амфолиты, пригодные для ИЭФ в области pH 4—8. По большинству параметров они удовлетворяли соответствующим требованиям, а единственный их недостаток заключался в неравномерном распределении электропроводности по градиенту pH. Эти опыты продемонстрировали, что амфолиты для ИЭФ относительно легко получить в лаборатории. В той же работе был описан метод оптического детектирования сфокусированных амфолитов, позволяющий контролировать их распределение при ИЭФ.

Опираясь на эти результаты, Ригетти и др. удалось синтезировать амфолиты, которые при ИЭФ формируют плавный стабильный градиент pH 3—9. Способ синтеза заключался в присоединении акриловой кислоты к ряду полиаминов — гексаметилентетрамину (ГМТА), ТЭТА, ТЭПА и ПЭГА, взятым по отдельности или в смеси (Righetti et al., 1975 a). Ниже приведены экспериментальные детали этого синтеза.

Непосредственно перед использованием все олигоамины следует перегнать в атмосфере азота. Вначале перегонка акриловой кислоты (содержащей около 20% *п*-метоксифенола) тоже проводилась в атмосфере азота, однако впоследствии мы предпочли заменить азот на воздух. Дело в том, что в атмосфере N_2 при высокой температуре может начаться спонтанная полимеризация с образованием олиго- и полиакриловых кислот. Кислород воздуха, напротив, может играть роль ингибитора аутополимеризации. Процесс перегонки ТЭТА, ТЭПА и акриловой кислоты не вызывает затруднений, поскольку при пониженном давлении эти вещества обладают достаточно низкой температурой кипения. Наиболее трудоемкой является перегонка ПЭГА, проходящая при температурах 200—290 °С и давлении 500 мкм ртутного столба.

Схема прибора для такой перегонки приведена на рис. 1.12, *А*. Необходимо использовать азот самого высокого качества. Примеси кислорода, содержащиеся в менее чистых препаратах азота, следует удалить каталитическим выжиганием или пропусканием через соответствующий фильтр. После очистки азот пропускают в раствор через очень тонкий капилляр, достающий до дна колбы. Ввиду высокой вязкости ПЭГА при низкой

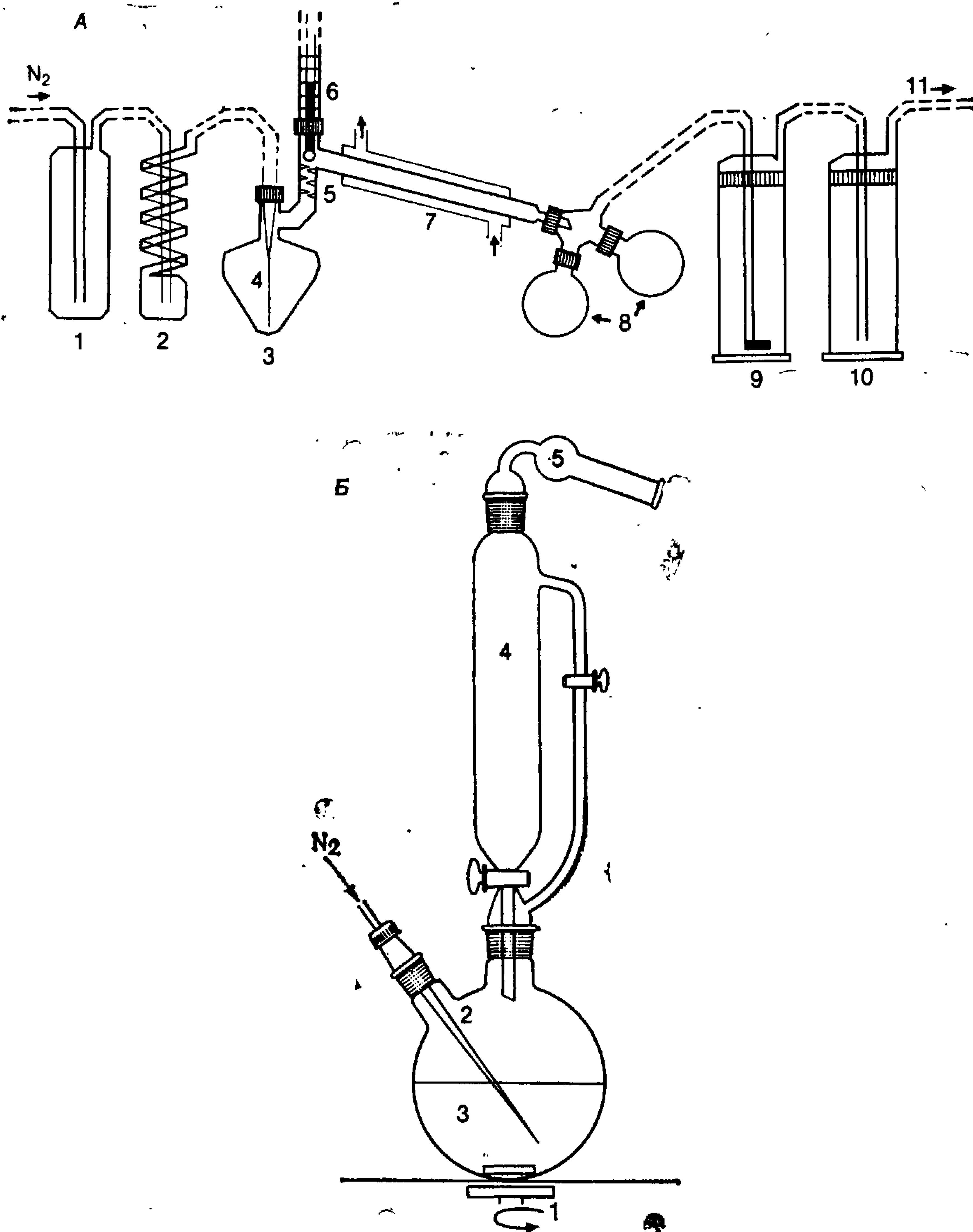
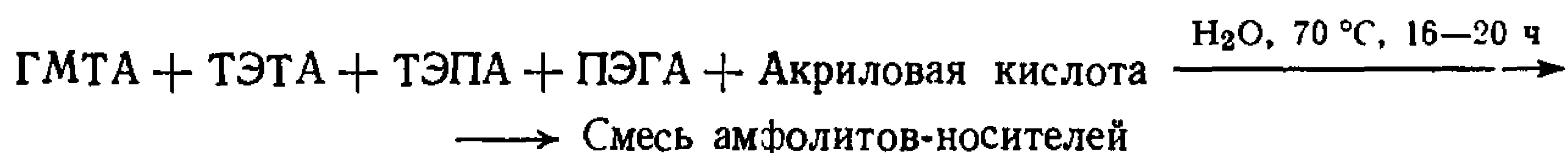


Рис. 1.12. *А*. Схема прибора для перегонки. 1 — медная проволока, нагреваемая в печи до 450 °С (для связывания примеси O_2), 2 — змеевик охлаждения, 3 — перегонная колба, 4 — капилляр для пропускания азота, 5 — дефлегматор, 6 — термометр, 7 — холодильник, 8 — приемные колбы, 9 — ловушка с концентрированной H_2SO_4, 10 — ловушка с $CaCl_2$, 11 — к вакуумному насосу. Заштрихованы места соединения на шлифах. (Righetti et al., 1975a.) *Б*. Прибор для синтеза амфолитов-носителей. 1 — магнитная мешалка, 2 — капилляр для пропускания азота, 3 — раствор полиамина, 4 — раствор акриловой кислоты в капельной воронке с боковым отводом, 5 — хлоркальциевая газоотводная трубка. (Gianazza E., Righetti P. G., неопубликованные данные.)

температуре для перегонки следует использовать только воздушный холодильник. Пониженное давление в системе создается вакуумным насосом, присоединенным к приемнику через ловушку с концентрированной H_2SO_4 (для поглощения паров аминов) и через расположенную ближе к насосу ловушку с осушителем. Пары воды можно также вымораживать в ловушке с сухим льдом. Синтез следует проводить сразу же после очистки реагентов. Акриловую кислоту лучше перегонять в последнюю очередь, так как после удаления ингибитора (метоксифенола) она немедленно начинает полимеризоваться. Избыток акриловой кислоты можно хранить в замороженном виде, желательно при −80°C или в жидком азоте.

Для проведения реакции полиамины и акриловую кислоту, взятые в определенной пропорции, помещают в прибор, изображенный на рис. 1.12, *Б*. Он состоит из двугорлой колбы, в которой находится 1,5 М раствор полиаминов в воде. Колба снабжена капилляром для пропускания азота и бюреткой, в которой находится акриловая кислота. В бюретку впаяна стеклянная трубка для выведения азота из колбы и обеспечения инертной атмосферы азота в самой бюретке. Акриловую кислоту добавляют по каплям до достижения молярного соотношения аминогрупп и карбоксильных групп 2 : 1, перемешивая реакционную смесь при помощи магнитной мешалки. Затем колбу закрывают и выдерживают при 70°C на качалке в течение 16—20 часов.

Реакция может быть представлена следующей схемой:



Полученные амфолиты разбавляют до концентрации 40% и хранят в замороженном виде во флаконах из темного стекла. Компоненты, придающие раствору желтую окраску, можно удалить обработкой активированным углем (Vinogradov et al., 1973). Однако это не всегда необходимо: окрашенные соединения тоже являются амфолитами и могут служить как бы «внутренними» маркерами для контроля за формированием градиента pH. С другой стороны, даже если при аналитическом ИЭФ окрашенные амфолиты не препятствуют разделению и детектированию белков, в препаративных вариантах, особенно при ИЭФ в градиенте плотности раствора сахарозы, присутствующие в системе окрашенные амфолиты могут оказаться помехой.

По ряду критериев амфолиты, полученные согласно описанной выше методике, практически эквивалентны имеющимся в продаже препаратам и отличаются главным образом только сравнительно высоким поглощением при 315 и 368 нм (Righetti

et al., 1975 a). Исходные реагенты для синтеза таких амфолитов легкодоступны, сам синтез прост в исполнении и позволяет за короткое время получать значительные количества продукта. Следует, однако, отметить, что сейчас многие олигоамины (в том числе и ПЭГА, дающий наиболее качественные амфолиты-носители) практически перестали поступать в продажу. Большинство фирм прекратило производство этих олигоаминов, обладающих, как выяснилось, канцерогенным действием. В одной из последних публикаций (Binion, Rodkey, 1981) в качестве коммерческого источника ПЭГА указана фирма Columbia Organic Chemicals; Columbia, SC, USA.

Для амфолитов рассмотренного типа характерно наличие четкого минимума электропроводности при pH около 6 (в диапазоне pH 5,5—6,5). На этот же диапазон pH приходится минимум буферной емкости и бо́льшая часть падения напряжения в системе. В результате вне этого участка компоненты могут оказаться «недофокусированными». Рост напряжения на участке с pH 5,5—6,5 — особенно при высоковольтном ИЭФ — может вызвать значительное выделение тепла со всеми вытекающими неприятными последствиями.

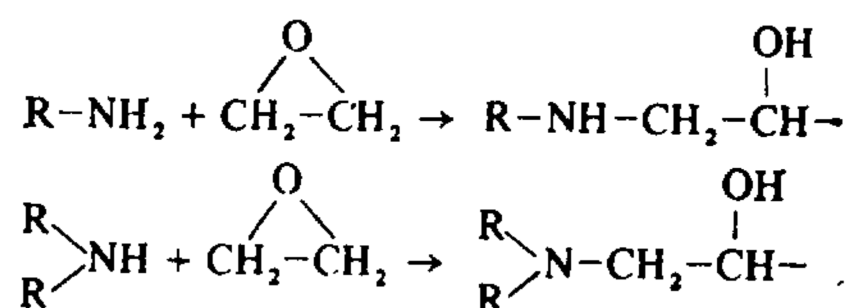
Для устранения этого недостатка методика получения амфолитов была усовершенствована путем использования в качестве алкилирующих агентов смеси акриловой и итаконовой кислот ($pK_1=3{,}85$ и $pK_2=5{,}45$) (Righetti et al., 1977 a). В результате присоединения к олигоаминам pK карбоксильной группы, принадлежащей остатку итаконовой кислоты и расположенной в β-положении по отношению к аминогруппе, изменяется от 3,85 до 3,35. При этом pK γ-карбоксильной группы понижается не более чем на 0,1. Электропроводность амфолитов-носителей, полученных с применением итаконовой кислоты, в диапазоне pH 5,5—6,5 на 400—500% выше, чем электропроводность традиционных амфолитов в этом диапазоне.

1.7.2. Метод Шарлионе и др.

Интересная модификация метода Вестерберга была описана в работе Charlionet et al., 1979, 1981. Известно, что в обычных амфолитах, производных акриловой кислоты, буферные свойства во всем диапазоне pH 2—11 зависят главным образом от набора значений pK различных аминогрупп, входящих в состав исходных компонентов. Несмотря на то что достаточно широкий спектр кислотных функций, привносимых α-карбоксильными группами (в фармалитах), β-карбоксильными группами остатков акриловой кислоты, а также β- и γ-карбоксилами остатков итаконовой кислоты, может обеспечить хорошую буферную емкость в диапазоне pH 2—6, качество амфолитов-носителей в

конечном счете определяется все-таки свойствами самих полиаминов. С повышением гетерогенности исходной смеси полиаминов повышается качество синтезируемых амфолитов. Было предложено (Charlionet et al., 1979) до обработки акриловой кислотой модифицировать смесь полиаминов набором алкилирующих агентов. В качестве таких агентов были взяты акриламид, N, N′-метиленбисакриламид (бис), 2, 3-эпоксипропанол-1 и 1, 2, 7, 8-диэпоксиоктан. В результате модификации происходит превращение первичных аминогрупп полиаминов во вторичные, а вторичных — в третичные. Более того, взаимодействие с бифункциональными реагентами (бис, диэпоксиоктан) приводит не только к модификации аминогрупп, как в случае монофункциональных акриламида и эпоксипропанола, но и к образованию межмолекулярных сшивок.

Реакция полиаминов с акриловой кислотой, акриламидом и бисом протекает по известному механизму нуклеофильного присоединения к β-углеродному атому α-β-ненасыщенных соединений. Взаимодействие полиаминов с эпоксисоединениями, вероятно, протекает по следующей схеме:



т. е. приводит к возникновению вторичных и третичных аминогрупп с примыкающими к ним вторичными β-гидроксильными группами.

Опытным путем удается подобрать соотношение реагентов, дающее высокогетерогенную смесь модифицированных полиаминов. Обработка такой смеси акриловой кислотой позволяет получить амфолиты-носители, обладающие хорошей электропроводностью и высокой буферной емкостью во всем диапазоне pH 3—10. При помощи ИЭФ получали фракции с очень узкими диапазонами pH (меньше 0,5 ед. pH), например с диапазоном pH 4,4—4,7 для разделения α_1-антитрипсинов (α_1-AT). В таком пологом градиенте pH удается разделить фенотипические варианты α_1-AT, изоточки которых различаются всего на 0,001 ед. pH. Если учесть, что ранее максимальное разрешение при ИЭФ оценивалось величиной 0,02 ед. pH (Vesterberg. Svensson, 1966), то приведенные выше данные свидетельствуют о 20-кратном увеличении разрешающей способности метода. Впрочем, следует отметить, что поступившее ранее сообщение о разрешающей способности 0,0025 ед. pH (Allen et al., 1974) не было подтверждено в последующих работах других авторов.

Опубликованная недавно работа Charlionet et al., 1981, посвящена изучению факторов, ограничивающих разрешающую способность при ИЭФ в естественном градиенте pH. Как известно (разд. 1.5.7), разрешающая способность (т. е. минимальное различие в значениях pI двух белков, при котором еще возможно их разделение) зависит, в частности, от крутизны градиента pH [(dpH)/dx]. Насколько пологим может быть этот градиент? Вероятно, минимальная величина общего изменения pH по длине разделительной колонки не может быть меньше 0,3 ед. pH. Попытки понизить этот предел, используя в качестве высокомолекулярных амфолитов набор продуктов сукцинилирования бычьего сывороточного альбумина, оказались неудачными. Белки не могут проявлять свойства хороших амфолитов-носителей, поскольку, как правило, содержат слишком мало функциональных групп, диссоциированных при pH=pI, и, следовательно, не обладают достаточной электропроводностью и буферной емкостью. Значительное повышение рабочей концентрации белков также невозможно ввиду опасности агрегации и преципитации в изоточке.

Можно допустить, что при использовании в качестве амфолитов-носителей набора полиамино-поликарбоновых кислот, аналогичных амфолитам Вестерберга, единственным фактором, ограничивающим разрешающую способность, является M_r этих амфолитов, т. е., чем выше M_r, тем выше должна быть разрешающая способность. Так, метод Шарлионе и др, позволяет получать высокоэффективные амфолиты с $M_r>5000$ (Charlionet et al., 1979).

Тем не менее, как будет показано в разд. 1.7.4, высказанное выше предположение на практике не подтверждается. Оказывается, что на самом деле молекулярная масса хороших амфолитов-носителей не должна превышать некоторого предельного значения.

1.7.3. Метод Джаста

В 1980 г. стал известен еще один вариант метода Вестерберга — синтез амфолитов-носителей по Джасту (Just, 1980). Сообщения об этих, как мы их одно время называли, «таинственных» амфолитах («mysterious strain» — Righetti et al., 1980) делались на каждом международном симпозиуме начиная с 1976 г., однако подробности об их строении и способе получения держались в тайне. В конце концов карты были открыты. Выяснилось, что и в этом случае синтез основан на присоединении α-β-ненасыщенных соединений к олигоэтиленолигоаминам, преимущественно к ПЭГА (источник этого реагента по-прежнему держится в секрете). И все же ряд нововведений делают метод

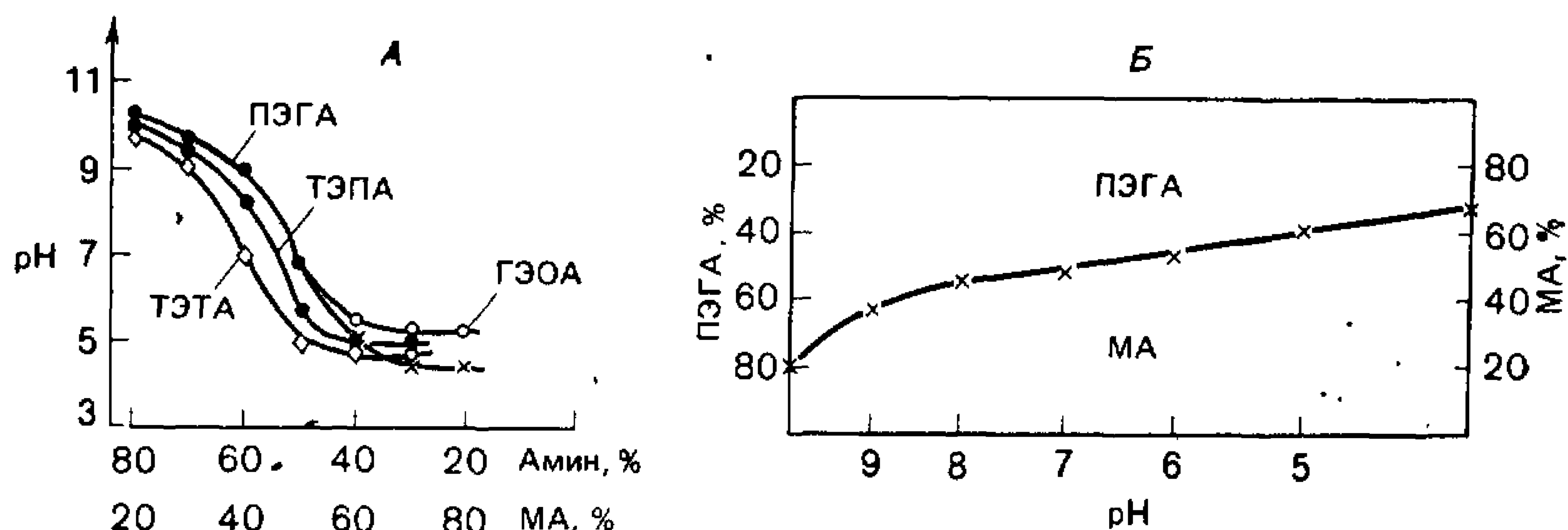


Рис. 1.13. *А*. Значения pH растворов синтетических амфолитов (после омыления эфирных групп), полученных при различном процентном соотношении исходных метанольных растворов: 4 *М* метилового эфира акриловой кислоты (МА) и 1 *М* олигоаминов в реакционной смеси (см. список сокращений в начале книги). *Б*. Шаблон для смесителя градиента типа Ultrograd (фирмы LKB), использованный при синтезе амфолитов в диапазоне pI 3,5—10 на основе ПЭГА. Для обеспечения постоянства содержания ПЭГА во всем интервале значений pH при смещении в кислую область постепенно увеличивали время реакции. На графике это отражается в постепенном увеличении масштаба по оси pH (Оба рисунка заимствованы из работы Just, 1980.)

Джаста весьма примечательным. Во-первых, вместо акриловой кислоты используется ее метиловый эфир. Во-вторых, реагенты перемешиваются в проточной системе и с переменным молярным соотношением, которое задается с помощью программируемого смесителя градиента типа Ultrograd (LKB). Обычно в резервуары смесителя помещают 1 *М* ПЭГА и 4 *М* раствор метилакрилата в метаноле. Реакция начинается при соотношении ПЭГА/метилакрилат 80 : 20 в мольных процентах (образование оснóвных амфолитов) и заканчивается при соотношении 35 : 65 (образование кислых амфолитов). На рис. 1.13,*А* показано распределение значений pH растворов амфолитов-носителей, полученных на основе ПЭГА и других олигоаминов. На рис. 1.13,*Б* изображен типичный шаблон для прибора Ultrograd, задающий соотношение концентраций ПЭГА/метилакрилат. После смешивания реагенты поступают в капиллярную колонку, термостатированную при 40 °С, и перемещаются по ней в течение 1,5 ч. На выходе из колонки при помощи коллектора собирают фракции, получая таким образом наборы амфолитов с узкими рабочими диапазонами pH (на кривых, приведенных на рис. 1.13*А*, точками отмечены границы семи таких диапазонов). Для поддержания более или менее постоянного выхода при синтезе амфолитов во всем диапазоне pH при переходе в область образования кислых амфолитов понижение эквивалентной концентрации аминогрупп компенсируют пропорциональным увеличением времени инкубации. Фактически постоянно увеличивают время, затрачиваемое на образование амфолитов, отвечающих

диапазону шириной в 1 ед. pH. На рис. 1.13*Б* это отражено в виде постепенного увеличения масштаба по оси pH. После отгонки метанола от продуктов реакции проводят омыление эфирных групп в течение 2 ч при 120 °С. Использование метилакрилата дает двойное преимущество: во-первых, его реакционная способность намного выше, чем у акриловой кислоты (при комнатной температуре время полуреакции 3,5 мин по сравнению с более чем 30 ч). Во-вторых, в метиловом эфире акриловой кислоты нет свободной карбоксильной группы, поэтому он летуч и его избыток может быть легко удален перегонкой.

1.7.4. Высокомолекулярные амфолиты Ригетти — Хьертена

Может показаться, что методы, рассмотренные в предыдущих разделах, охватывают все возможные подходы к синтезу амфолитов-носителей. Однако это не совсем так. В частности, интересы нашей исследовательской группы в течение ряда лет были связаны с ИЭФ пептидов (разд. 5.1). Несмотря на значительные успехи в развитии аналитического ИЭФ пептидов, попытки препаративного разделения не давали желаемых результатов. Оказалось, что никакие методы, даже такие совершенные, как гидрофобная хроматография (Gelsema et al., 1980b), не позволяют полностью отделить небольшие пептиды от примеси амфолитов-носителей. Для решения этой задачи можно было бы попытаться использовать низкомолекулярные амфолиты (Gasparic, Rosengren, 1974). Однако эти амфолиты перестали поступать в продажу; кроме того, их также едва ли удалось бы полностью отделить от смеси пептидов. К тому же, как показано в работе Charlionet et al., 1981, чем меньше M_r амфолитов, тем ниже качество образуемого ими градиента pH. Это следует и из расчетов, приведенных в работе Gelsema et al., 1979, которые показали, что отношение молярной буферной емкости к электропроводности амфолитов пропорционально кубическому корню из их молекулярной массы.

Мы решили подойти к проблеме препаративного разделения пептидов с противоположной стороны, попытавшись использовать высокомолекулярные амфолиты (Righetti, Hjertèn, 1981). Вначале были опробованы два подхода. Высокомолекулярные амфолиты получали, модифицируя акриловой кислотой олигоамины, предварительно «пришитые» к растворимым декстранам (M_r в диапазоне 10 000—20 000). В другом варианте, проводя карбамилирование или малеилирование альбумина и гемоглобина, получали набор компонентов с разной степенью модификации и различными значениями pI в интервале 2—3 ед. pH. Ни один из этих подходов не принес успеха. В обоих случаях полученные амфолиты содержали крайне мало буферных групп на

единицу молекулярной массы, что, как известно, отрицательно сказывается на разрешающей способности при ИЭФ (Charlionet et al., 1981). Исходя из этого, мы разработали способ синтеза амфолитов на основе высокополимерного полиэтиленимина (ПЭИ) с M_r 40 000—60 000 и акриловой кислоты. При проведении синтеза в стационарных условиях, аналогично традиционной методике Вестерберга (разд. 1.7.1), оказалось, что полученная смесь амфолитов содержит недостаточно компонентов со значениями pI в нейтральной области. Для устранения этого недостатка пришлось применить модифицированную методику Джаста. Как показано на рис. 1.14, в проточной камере раствор ПЭИ смешивали с линейным градиентом концентрации раствора акриловой кислоты. Идущую по трубке реакционную смесь делили на порции по 1 мл, периодически вводя пузырьки азота, и направляли ее в термостатируемую капиллярную спираль. В типичном опыте в колбу помещали 50 мл 10%-ного ПЭИ, а в сосуды смесителя градиента — резервуар (Р) и смеситель (С) — по 25 мл раствора акриловой кислоты с концентрацией 18 и 2% соответственно. Градиент концентрации акриловой кислоты был подобран таким образом, чтобы степень модификации аминогрупп для амфолитов в щелочной области составляла около 10%, а кислой достигала 100%. После заполнения реакционной спирали ее перекрывали и термостатировали 48 ч при 80 °С.

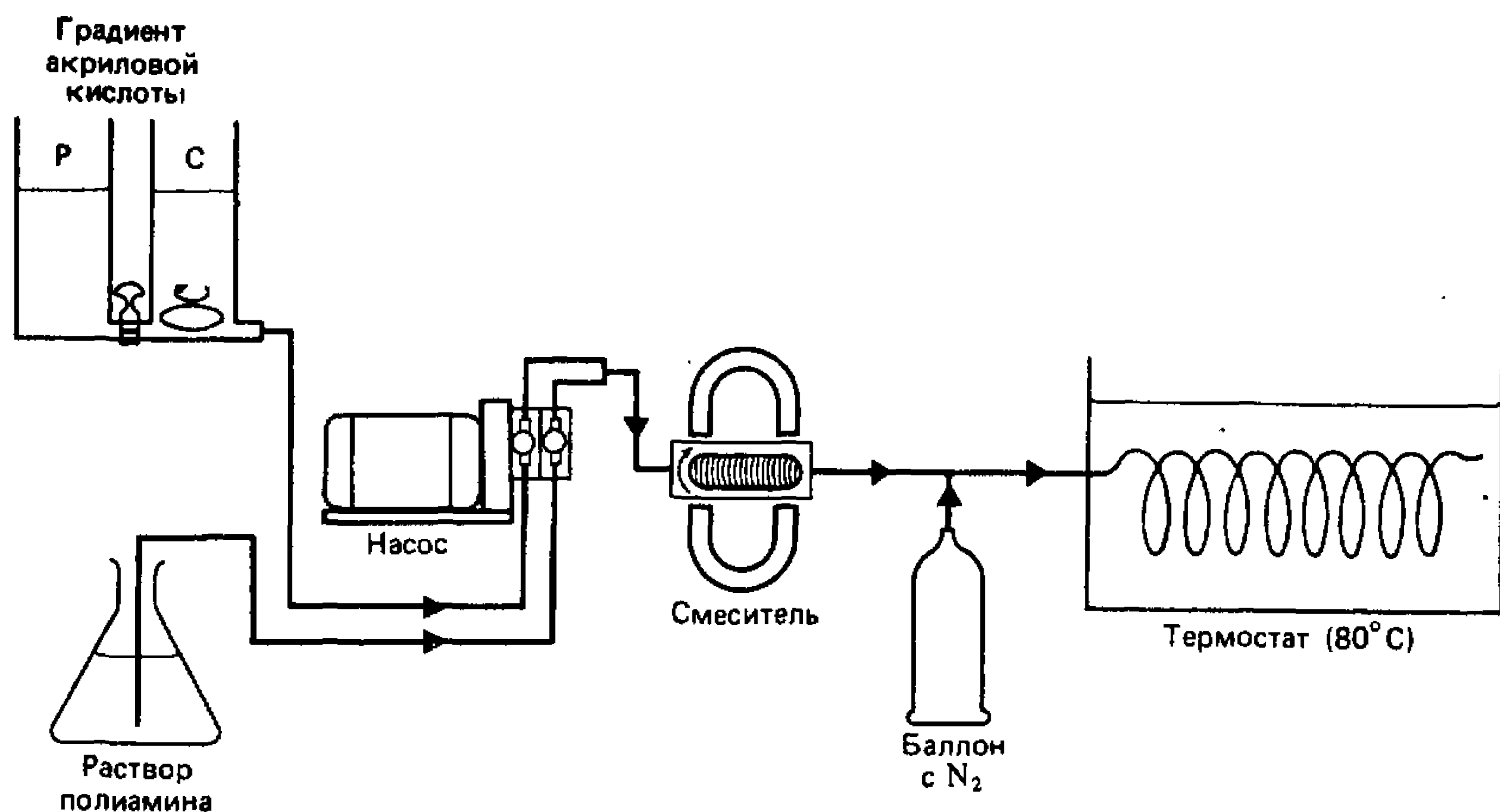


Рис. 1.14. Синтез высокополимерных амфолитов-носителей. 10%-ный раствор полиэтиленимина смешивают с линейным градиентом концентрации (2—18%) акриловой кислоты (магнит в смесителе вращается вокруг длинной оси). Идущую по трубке реакционную смесь делят на порции по 1 мл с помощью пузырьков азота. После заполнения спирального капилляра реакционную смесь инкубируют 48 ч при 80 °С. (Righetti, Hjertén, 1981.)

Полученные «гигантские» амфолиты-носители были успешно использованы для препаративного разделения модельных дипептидов. Выход достигал 85%; очищенные пептиды были свободны от примесей. Тем не менее высокомолекулярные амфолиты этого типа имеют ряд недостатков — они весьма склонны к агрегации и преципитации из-за образования множества ионных связей, особенно при взаимодействии кислых и щелочных компонентов. Кроме того, эти амфолиты, так же как и амфолиты обычных размеров, характеризуются очень низкой электропроводностью на участке градиента с pH около 6. Таким образом, предположение о том, что увеличение M_r амфолитов должно непременно сопровождаться повышением разрешающей способности (Charlionet et al., 1981), в действительности является ошибочным. По достижении некоторого значения M_r (по-видимому, начиная уже с M_r 5000—6000) дальнейшее его увеличение не приводит к повышению качества образуемого градиента pH. На самом деле, по данным Мюрела (персональное сообщение), увеличение числа атомов азота в цепи свыше 12—15 не сопровождается улучшением амфолитов-носителей.

1.8. Методы детектирования амфолитов-носителей

Можно назвать по крайней мере две задачи, для решения которых необходимо располагать каким-либо методом обнаружения зон сфокусированных амфолитов. Это, во-первых, проблема проверки качества имеющихся в продаже препаратов. При ИЭФ амфолиты должны образовывать многочисленные дискретные зоны, параллельные друг другу и перпендикулярные направлению электрического поля. Во-вторых, регистрируя зоны амфолитов, можно контролировать сам процесс изоэлектрического фракционирования. Так, сильно искаженные или волнообразные зоны могут свидетельствовать о том, что в препарате содержится значительное количество солей или ионов с буферными свойствами.

Первые данные о распределении амфолинов при ИЭФ были получены на основании регистрации зон, характеризующихся изменением показателя преломления проходящего света (Jonsson et al., 1973; Rilbe, 1973b). Авторы предположили, что эти зоны соответствуют зонам хорошо сфокусированных амфолитов. Существуют два подхода к рефрактометрическому обнаружению зон (Fries, 1976). Это «теневой» метод, где за основу берется вторая производная показателя преломления ($d^2n/dl^2=0$), и метод Топлена — Шлирена, в котором рассматривается непосредственно форма градиента показателя преломления ($dn/dl=0$).

В работе Righetti et al., 1975a, теневой метод был использован для оценки качества «самодельных» амфолитов-носителей,

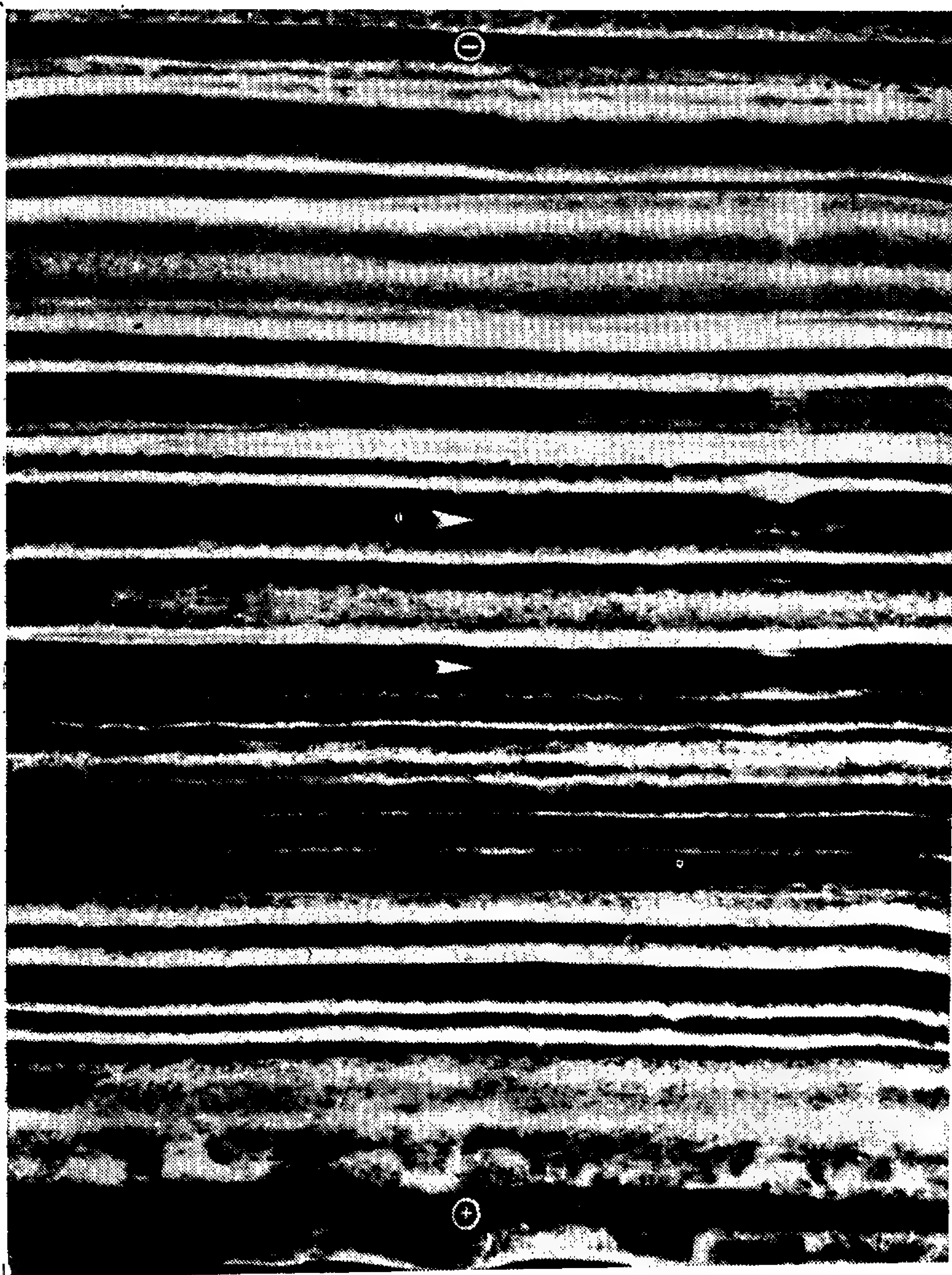


Рис. 1.15. Амфолиты, полученные на основе ТЭТА, сфокусированные в пластине геля. Фотография геля (после ИЭФ) сделана на черном фоне с боковым освещением. «Пучки» на фотографии отвечают кластерам сфокусированных амфолитов. Фотографировался прозрачный неокрашенный гель; детектирование амфолитов основано на измерении коэффициента преломления. ⊕ — анод, ⊖ — катод. (Righetti et al., 1975a.)

синтезированных на основе различных олигоаминов. На рис. 1.15 показана картина распределения амфолитов, синтезированных из ТЭТА и акриловой кислоты при соотношении аминный азот: карбоксильный углерод = 2 : 1. Метод позволяет различить ряд

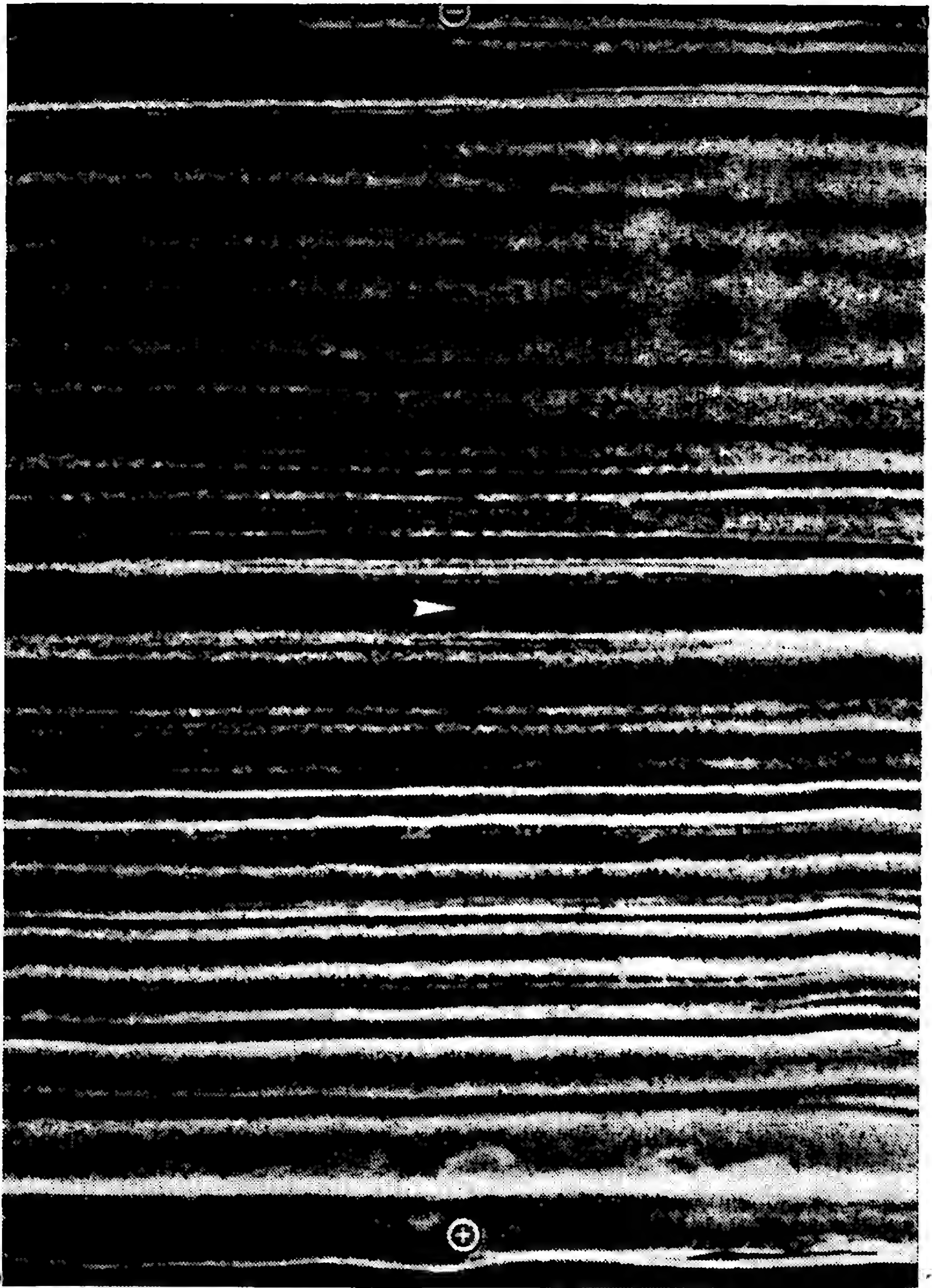


Рис. 1.16. Амфолиты, полученные на основе ТЭПА, сфокусированные в пластине геля. Все условия такие же, как и в случае рис. 1.15. (Righetti et al., 1975a.)

интенсивных зон, которые скорее всего содержат кластеры амфолитов, а не индивидуальные компоненты. Из данного набора амфолитов нельзя сформировать плавный градиент во всем диапазоне pH 3—10, распределение электропроводности по градиенту очень неравномерно, выявляется несколько больших раз-

рывов, соответствующих участкам с очень низким содержанием амфолитов.

Амфолиты более высокого качества могут быть получены на основе ТЭПА. Они содержат значительно больше компонентов, особенно в кислой области градиента pH. Кластеры амфолитов более компактны и расположены теснее, меньше участков с пониженной концентрацией амфолитов (рис. 1.16). Число компонентов в щелочной области градиента pH меньше, чем в кислой, но больше, чем в щелочной области градиента, образованного производными ТЭТА. Тем не менее распределение электропроводности по всей длине геля крайне неравномерно, с минимумом при pH 5—7.

При проведении синтеза на основе индивидуальных олигоаминов наилучших результатов удается добиться, используя ПЭГА. В этом случае наблюдается значительное число зон хорошо сфокусированных индивидуальных компонентов как в кислой, так и в щелочной области pH, градиент более плавный, а электропроводность выше и распределена более равномерно, чем в случае производных ТЭТА или ТЭПА. Естественно, набор индивидуальных компонентов можно расширить, смешивая в разумных соотношениях амфолиты, полученные присоединением акриловой кислоты к различным исходным олигоаминам.

Недавно для наблюдения за распределением амфолитов в геле было предложено (Edwards, Anderson, 1981) сочетание метода Шлирена (по Fries, 1976) с использованием решетки Ронши (по Kolin, 1958). По мнению авторов, «волны», наблюдаемые на поверхности геля, образуются за счет осмотических процессов, которые вызывают перенос воды от участков с пониженной концентрацией амфолитов к примыкающим зонам.

Были предложены и другие методы детектирования зон при ИЭФ амфолинов. Так, в работе Felgenhauer, Pak, 1973, их обнаруживали методом карамелизации глюкозы. После фокусирования в тонком слое сефадекса по методу Radola, 1973 a, b, на гель накладывали лист фильтровальной бумаги, смоченный 5%-ным раствором глюкозы. После 8 мин инкубации при 110 °C продукты карамелизации можно было регистрировать по флуоресценции при возбуждении светом с длиной волны 350 нм или при дневном освещении. Этим методом удавалось различить 38 дискретных зон в случае имеющихся в продаже амфолитов диапазона pH 3,5—10.

Еще один метод регистрации основан на образовании нерастворимых комплексов амфолинов с красителем кумасси фиолетовым в полунасыщенном растворе пикриновой кислоты в 5%-ной уксусной кислоте. Этот метод позволяет обнаруживать кислые и нейтральные, но не щелочные амфолины, которые образуют растворимые комплексы (Frater, 1970). Амфолины фир-

мы LKB были проанализированы с помощью ионообменной хроматографии на сульфополистирольной смоле с использованием автоматического аминокислотного анализатора (Brown et al., 1976). В смеси амфолинов широкого диапазона pH 3,5—10 удавалось обнаружить 60—70 нингидринположительных компонентов. Для обеспечения полноты элюции амфолинов с ионообменника приходилось использовать градиент pH в элюенте от 3,8 до 11,0. Профиль элюции щелочных и кислых амфолитов свидетельствует о том, что помимо величины pI на хроматографическое поведение амфолитов заметно влияют степень их гидрофобности и молекулярная масса.

В работах Bonitati, 1980, 1981, описан метод обнаружения зон амфолитов-носителей в УФ-свете непосредственно в слое гранулированного геля или на бумажной реплике. Флуоресценция амфолитов различных марок убывает в следующем ряду: сервалиты>амфолины>фармалиты. При облучении коротковолновым (254 нм) и длинноволновым (350 нм) УФ-светом сфокусированные сервалиты дают серию четких чередующихся темных и светлых зон с пурпурной и желто-зеленой окраской соответственно. Как показано на рис. 1.17, при коротковолновом облучении различимы 56 полос — 29 темных и 27 светлых. При длинноволновом облучении проявляются 50 полос — по 25 каждого типа. Полученные картины распределения комплементарны — положение большинства полос совпадает, при этом светлой полосе на одной картине, как правило, соответствует темная полоса на другой, и наоборот. Этот метод детектирования может быть использован для решения ряда аналитических задач — для локализации и идентификации определенных белковых полос в геле или на бумажной реплике, для определения значений pI сфокусированных белков и для оценки качества различных партий амфолитов-носителей. На препаративном уровне флуоресценция зон сервалитов может быть использована в качестве метода косвенного недеструктивного детектирования белковых зон, для последующего вырезания соответствующих участков геля и извлечения из них белка.

1.9. Фракционирование амфолитов-носителей

Для получения амфолитов с узким рабочим диапазоном pH могут использоваться два разных подхода. Первый заключается в варьировании молярного соотношения амин: кислота в реакционной смеси. Несмотря на простоту, этот метод с трудом поддается контролю, его недостатком является загрязненность продукта избытком свободных аминов или кислот (Righetti et al., 1975 а). Более совершенный подход, используемый и при производстве коммерческих препаратов, — это изоэлектрическое

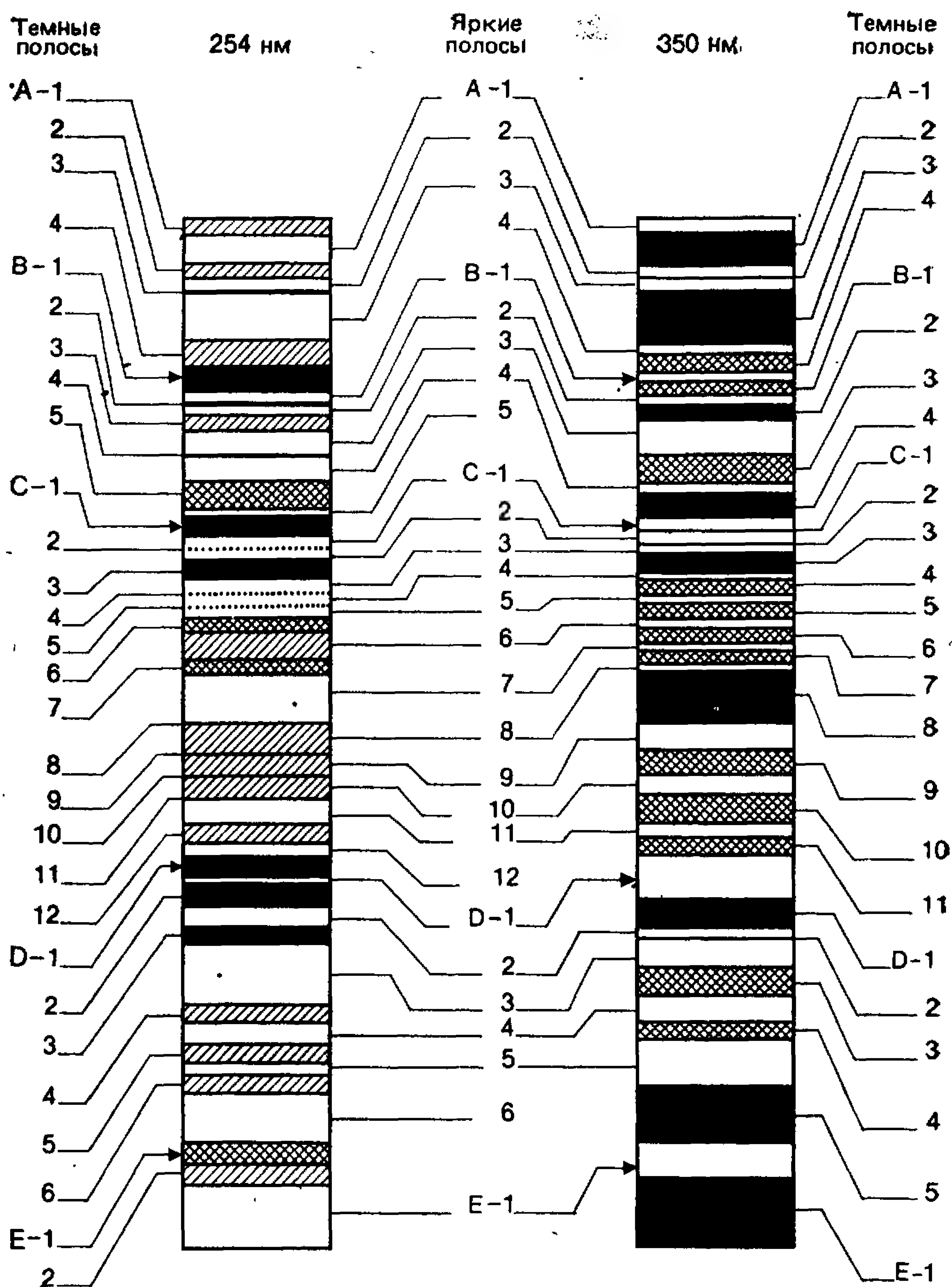


Рис. 1.17. Флуоресцентные профили изоэлектрического распределения сервалитов. Идентификация флуоресцирующих полос проводилась по классификационной системе, предложенной Bonitati, 1980. Стрелками указаны темные полосы, разделяющие профиль на участки A—E. Три яркие полосы C-(8,9,10)-b(254 нм) (индекс b от англ. bright) оттенены на рисунке для того, чтобы подчеркнуть, что они, как правило, темнее других ярких b-полос. Эта картина распределения в основном воспроизводится от опыта к опыту. Однако иногда наблюдаются следующие характерные особенности (описаны по более коротковолновому профилю): (а) участок A оказывается сжатым, а первые 2—3 полосы в нем исчезают; (б) для одной партии сервалитов участок A оказался очень темным, и индивидуальные полосы на нем едва различимыми; (в) в нескольких опытах между темными полосами B-4-d и B-5-d (индекс d — от англ. dark) появлялась узкая темная полоса средней интенсивности; (г) полосы (C-(11—12)-d и три нижние темные полосы на участке D иногда оказываются очень бледными. Все эти изменения коротковолнового профиля сопровождаются соответствующими изменениями в длинноволновом профиле. (Bonitati 1980.)

фракционирование смеси амфолитов широкого диапазона pI. Наборы амфолитов с рабочим диапазоном в 1—2 ед. pH могут быть получены с помощью простого метода (Gianazza et al. 1975), основанного на принципе ИЭФ в потоке (Fawcett, 1973). Этот метод имеет ряд преимуществ по сравнению с ИЭФ в многокамерных электролизерах (Rilbe, 1970; Vesterberg, 1969), так как он лишен недостатков, связанных с осмотическим давлением и возникновением потенциала на мембранах, а также характеризуется незначительным анодным окислением амфолитов.

На практике применяются оба подхода. Так, фирмы LKB и Serva применяют для получения амфолинов и сервалитов с узкими диапазонами pI многокамерные электролизеры. В то же время фирма Pharmacia предпочитает использовать для этого направленный синтез.

Для разделения амфолитов-носителей пригоден прибор для конвекционного зонального ИЭФ, описанный в работе Valmet, 1969. С его помощью автору удалось разделить набор амфолинов pH 3,5—10 на множество фракций с рабочим диапазоном около 0,2 ед. pH. Впрочем, на самом деле интервал pH, в котором еще можно успешно проводить изоэлектрическое фракционирование, должен быть не уже 0,3 ед. pH (Charlionet et al., 1981).

Для получения небольших количеств амфолитов с узким рабочим диапазоном pH фракционирование можно проводить в обычных колонках (110 и 440 мл) в градиенте плотности (Vesterberg et al., 1967) или в слое гранулированного геля (Radola, 1973 a, 1975). В работе Otavsky et al., 1977, разделение проводилось в горизонтальной форме, заполненной смесью сефадекса и певикона С870 (гранулы, изготовленные из поливинилхлорида и поливинилацетата). Для извлечения амфолитов после ИЭФ материал соответствующих сегментов слоя центрифугировали через пористое стекло.

Особенно привлекательны проточные системы синтеза амфолитов (Just, 1980; Righetti, Hjertèn, 1981), при которых отбор фракций на выходе из реакционной капиллярной спирали позволяет непосредственно получать наборы амфолитов с узким диапазоном pH.

В принципе для фракционирования амфолитов можно использовать любой из вариантов препаративного ИЭФ. В частности, описано разделение амфолитов в полиэтиленовой капиллярной спирали (Macko, Stegemann, 1970) и в тонкослойном проточном аппарате (Just et al., 1975 a, b). Оборудование, в котором в качестве антиконвекционной среды используются системы, отличные от капиллярных (например, гранулированный гель), выгодно применять в тех случаях, когда нет необходимости отделять фракции амфолитов от инертного носителя.

1.10. Основные свойства амфолитов-носителей

В этом разделе мы попытаемся обобщить имеющиеся на сегодня данные о физико-химических свойствах амфолитов-носителей. Следует иметь в виду, что эти данные относятся в основном к амфолинам, поскольку амфолиты этого типа производятся (фирмой LKB) начиная уже с 1967 г. Будут рассмотрены также отдельные свойства сервалитов и фармалитов. Основные свойства амфолитов-носителей в обобщенном виде приведены в табл. 1.4 (Haglund, 1975).

Таблица 1.4. Свойства амфолинов и других амфолитов-носителей (по Haglund, 1975)

Фундаментальные «классические» свойства:
- а) в изоэлектрической точке подвижность буферного иона равна нулю
- б) хорошая электропроводность
- в) хорошая буферная емкость

Рабочие свойства:
- а) хорошая растворимость
- б) не мешают детектированию образцов
- в) не влияют на свойства образцов
- г) могут быть отделены от образцов

Неблагоприятные свойства:
- а) проявление эффекта «плато», дрейф градиента pH
- б) изменение химических свойств образцов
- в) комплексообразование

1.10.1. Молярность и ионная сила амфолитов-носителей

Проведение опытов по ИЭФ заметно усложнялось из-за отсутствия данных о молярности и ионной силе (*I*) в зонах сфокусированных амфолитов-носителей. Единственный параметр, с надежностью поддающийся определению по окончании ИЭФ как в сахарозном градиенте, так и в геле, — это pH. С другой стороны, при электрофоретическом фракционировании все три названных выше физико-химических параметра, которые определяют свойства разделяющей буферной среды, точно известны экспериментатору. Ввиду этого вплоть до сегодняшнего дня представлялось совершенно невозможным корректно сопоставить данные, полученные независимо при электрофорезе и при ИЭФ. Незнание параметров среды порождало неопределенность при трактовке данных ИЭФ, особенно в случае фракционирования клеток, pI которых, как известно, существенным образом зависит от ионной силы среды (Sherbet, 1978).

Однако недавно была продемонстрирована принципиальная возможность точного определения молярности сфокусированных

амфолинов (McGuire et al., 1980). При фокусировании 1%-ного раствора амфолинов в свободном потоке жидкости в проточном аппарате Ханнига осмометрическое определение молярности в 48 элюируемых фракциях дало значение 9—10 мМ для всего диапазона pH 3,5—10. Эта величина хорошо согласуется с расчетным значением 15 мМ, полученным в работе Gelsema et al., 1978, исходя из предполагаемого среднего значения мол. массы амфолинов $M_r=700$.

Величину ионной силы, которая при ИЭФ исчезающе мала, измерить значительно сложнее. С самого начала было ясно, что классическое определение ионной силы (Lewis, Randall, 1921)

$$I=(1/2)\Sigma c_i z_i^2, \qquad (35)$$

неприложимо к условиям ИЭФ. С другой стороны, все попытки непосредственно измерить I при ИЭФ также оказались неудачными. Решение было найдено (Righetti, 1980) с помощью ИЭФ эритроцитов, значение pI которых, как известно, существенно зависит от ионной силы буферного раствора (Seaman, 1975). Графическое сопоставление данных электрофореза и ИЭФ эритроцитов (см. рис. 1.18) и их экстраполяция дает значение $I=0,5$ мг-ион/л для сфокусированных 1%-ных амфолинов. Расчеты на основе теоретического анализа и определения электропроводности также приводят к величине $I=0,5$—1 мг-ион/л. Были предложены следующие уравнения, связывающие ионную силу (I) с молярностью сфокусированных амфолитов-носителей ($C_{амф}$) и молярностью протонов (C_H) или гидроксилов (C_{OH}) при данном значении pH:

$$I=(1/20)\bar{C}_{амф}+C_H \text{ в диапазоне pH 2,5—7,} \qquad (36)$$

$$I=(1/20)\bar{C}_{амф}+C_{OH} \text{ в диапазоне pH 7—11.} \qquad (37)$$

В работе Gelsema et al., 1978, на основе теоретического анализа, проведенного (Rilbe, 1976) для оценки величины ионной силы раствора сфокусированных амфолинов, было получено следующее неравенство:

$$I<(1/3)\bar{C}_{амф}+(1/2)C_H. \qquad (38)$$

Исходя из средних $M_r=700$ и концентрации 15 мМ, предельное значение ионной силы для сфокусированных 1%-ных амфолинов в этой работе оценивалось величиной 5 мг-ион/л. Это примерно в 10 раз выше, чем полученное мною значение I. Обращаясь ко мне в своем письме (13 мая 1980 г., Утрехт), Гельсема отмечал, что, по его мнению, следует делать различие между эффективным равновесным значением I, которое проявляется на определенном участке в процессе ИЭФ, и ионной силой во фракциях, собранных по окончании ИЭФ. Он привел следующий расчет, исходя из минимального значения электропровод-

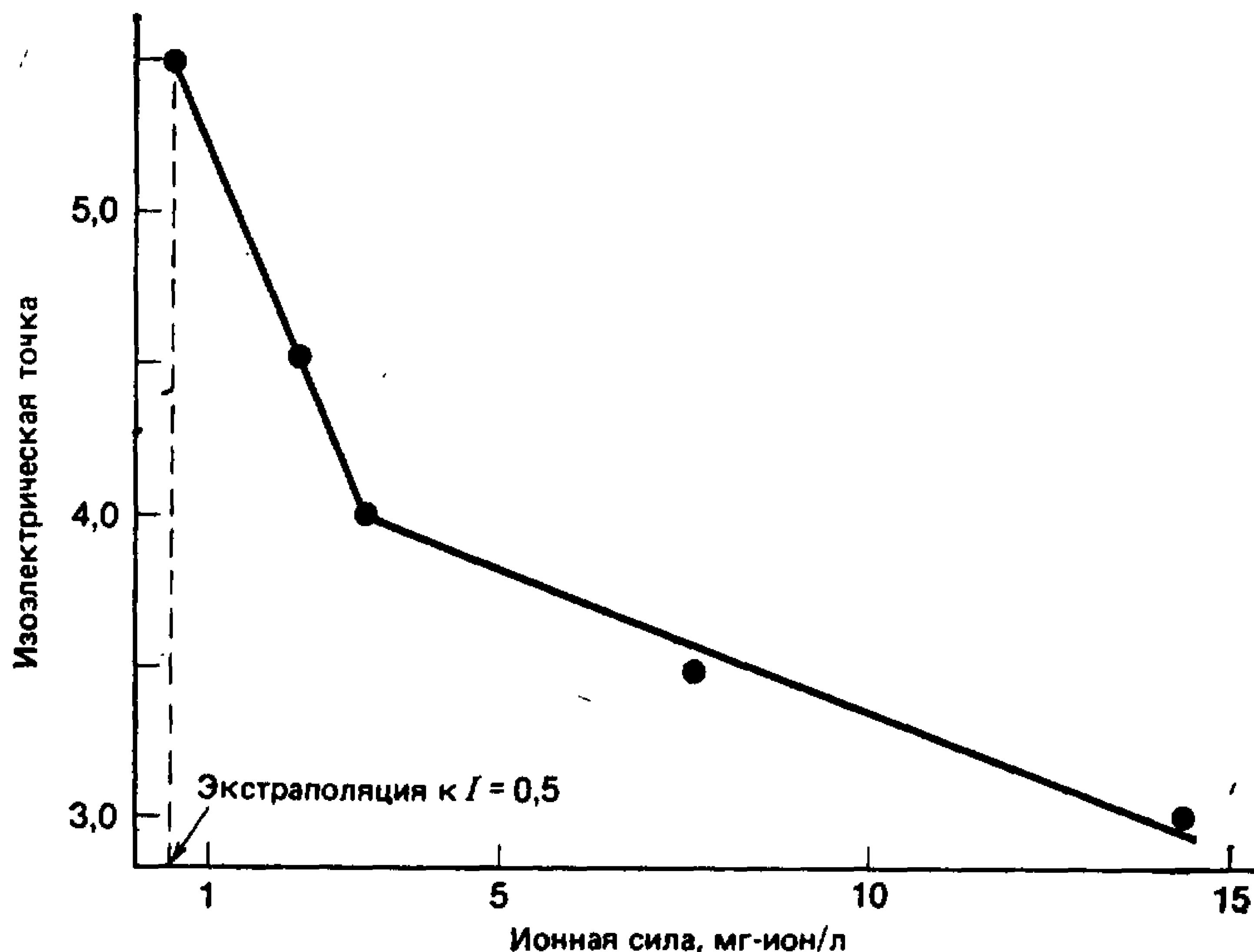


Рис. 1.18. Зависимость pI эритроцитов от ионной силы среды. Расположение точек 2—5 (слева направо) основано на электрофоретических данных, приведенных в работе Seaman, 1975. Экстраполяция кривой, построенной по этим точкам, до значения pI эритроцитов, определенного методом ИЭФ (Just et al., 1979; McGuire et al., 1980), позволяет определить значение ионной силы среды при ИЭФ. (Righetti, 1980.)

ности (χ) сфокусированных амфолинов $\chi = 0{,}5 \cdot 10^{-4}$ Ом$^{-1}$·см$^{-1}$ (по данным Гельсема, согласованным с моими) и считая, что

$$\chi = F \Sigma c_i z_i u_i, \tag{39}$$

где F — постоянная Фарадея, u_i — подвижность ионов с зарядом z_i при концентрации c_i. На участке с pH 5—8, где ионы воды или электродных растворов не дают заметного вклада в электропроводность, значение суммы $\Sigma c_i z_i u_i$ составляет

$$\frac{\chi}{F} \simeq 0{,}5 \cdot 10^{-9}\ (\text{г-экв} \cdot \text{Ом}^{-1} \cdot \text{см}^{-1} \cdot \text{Кл}^{-1}). \tag{40}$$

Поскольку в узком интервале pH во фракциях после ИЭФ z_i амфолитов может принимать значения 0, +1 или −1, то $\Sigma c_i z_i u_i = \Sigma c_i u_i$. Если мы предположим, что все однозарядные амфолиты имеют примерно одинаковую подвижность ($\bar{u}$), то получим

$$\Sigma c_i z_i u_i = \Sigma c_i u_i = \bar{u} \Sigma c_i \simeq 0{,}5 \cdot 10^{-9}\ \text{г-экв} \cdot \text{Ом}^{-1} \cdot \text{см}^{-1} \cdot \text{Кл}^{-1}. \tag{41}$$

Подставляя в уравнение (41) найденное мною значение $I = 0{,}5$ мМ, т. е. $0{,}5 \cdot 10^{-6}$ моль/см^3, получаем среднее значение

подвижности $\overline{u}=10^{-3}$ см$^2\cdot$В$^{-1}\cdot$с$^{-1}$. Это значение явно завышено, поскольку максимальная подвижность даже низкомолекулярных ионов, например ацетата и бензоата, составляет лишь $0{,}4\cdot10^{-3}$ и $0{,}3\cdot10^{-3}$ см$^2\cdot$В$^{-1}\cdot$с$^{-1}$ соответственно. Поэтому, по мнению Гельсема, для сфокусированных 1%-ных амфолинов значение $I=1$—2 мг-ион/л представляется более правдоподобным.

1.10.2. Изоэлектрическая и изоионная (изопротонная) точки

Молекула амфолита по определению содержит более одной протолитической группы, в том числе диссоциирующие группы и кислотного, и оснóвного типов. Для характеристики амфолитов наибольшее значение имеют два родственных понятия — изоэлектрическая точка (pI) и изоионная точка. pI определяется как значение pH, при котором электрическая подвижность амфолита равна нулю. Изоионная точка — это значение pH, при котором концентрация анионов равна концентрации катионов, т. е. суммарный заряд амфолита равен нулю.

Экспериментальным путем изоионную точку определяют как значение pH раствора амфолита, которое не изменяется при дальнейшем повышении его концентрации. В математическом виде это означает, что

$$\left[\frac{\partial(\mathrm{pH})}{\partial C}\right]_c=0, \tag{42}$$

где C — концентрация данного амфолита, а c — концентрация сильной кислоты или основания. Поскольку понятие «изоионная точка» по смыслу не совсем соответствует этому уравнению, вместо него в работе Rilbe, 1973 a, было предложено понятие «изопротонная точка». В многочисленных опытах по ИЭФ было установлено, что значения изоэлектрической и изоионной (изопротонной) точек амфолитов очень близки, поэтому в дальнейшем мы не будем делать различий между этими понятиями. Это относится и к белкам, поскольку при ИЭФ, как правило, не наблюдается взаимодействия между белковыми зонами и буферными ионами (амфолитами-носителями; см. также разд. 4.11). Тем не менее значение pI белка, установленное экстраполяцией данных обычного электрофореза, в тех случаях, когда белок связывает значительное количество ионов буфера, к нулевой подвижности и нулевой ионной силе, может заметно отличаться от истинной изопротонной точки. Многочисленные примеры, иллюстрирующие неадекватность такого подхода (Cann, 1966), свидетельствуют о том, что ИЭФ — это, вероятно, единственный метод, позволяющий надежно определить pI белка (Righetti, Caravaggio 1976; Righetti et al., 1981).

1.10.3. Молекулярная масса

Некоторые разногласия существуют в связи с определением истинного значения молекулярной массы амфолитов. Различные группы исследователей называют самые разные диапазоны значений M_r: 5000—7000 (Gierthy et al., 1979); 800—1200 для сервалитов, 1000—6000 для амфолинов и 1000—15000 для фармалитов (Radola, 1980b; Goerth, Radola, 1980). В качестве верхнего предела приводилось даже значение 20 000 (Baumann, Chrambach, 1975). Отмечалось, что такое высокое значение M_r характерно для весьма существенной части молекул амфолита, особенно для амфолитов щелочного диапазона pH. С другой стороны, непосредственное определение молекулярной массы амфолинов методом гель-фильтрации и осмометрии дает среднее значение $M_r=700$. При этом только 0,7% молекул имеют $M_r>1000$ и 0,03% — M_r в районе 4000 (Haglund, 1975). Поскольку ученые, как правило, не очень доверяют данным фирм-поставщиков, следует добавить, что эти данные были независимо подтверждены в работе Gelsema et al., 1979. Было показано, что практически во всем диапазоне pH M_r (фарм.) $>M_r$ (амф.) $>$ $>M_r$ (серв.). Для всех трех марок амфолитов компоненты с наибольшими значениями M_r обнаружены в кислой, а не в щелочной области, что прямо согласуется с результатами теоретического анализа (Gianazza et al., 1979 a). Были получены расчетные значения средней молекулярной массы для амфолинов ($M_r=710$) и для фармалитов ($M_r=870$).

Мне представляется крайне важным критически проанализировать все эти данные, поскольку решение вопроса об истинной величине M_r амфолитов весьма существенно для каждого биохимика, занимающегося ИЭФ белков.

Ряд экспериментальных фактов свидетельствует против концепции высокомолекулярных амфолитов. Во-первых, при осаждении белков сульфатом аммония (до 100% насыщения) в растворе остается до 99,99% содержащихся в смеси амфолитов-носителей (Nilsson et al., 1970). Высокомолекулярные амфолиты в этих условиях скорее всего должны были бы преципитировать. Во-вторых, после ИЭФ в геле пептиды, начиная с тех, которые характеризуются некоторыми минимальными значениями M_r около 1500, т. е. 12—14 аминокислотных остатков, могут быть зафиксированы и окрашены при обработке геля смесью краситель—трихлоруксусная кислота (ТХУ) (Righetti, Chillemi, 1978). Амфолиты-носители в этих условиях полностью растворимы.

Определение M_r имеющихся в продаже амфолитов (за исключением сервалитов, которые, по-видимому, не окрашиваются) в работе Gierthy et al., 1979, было основано на данных

электрофореза в геле в присутствии ДДС-Na. В этой системе наибольшие значения M_r 5000—7000 были получены для самых щелочных компонентов (pH 9—11). В то же время, как нам известно, щелочные компоненты на самом деле обладают наименьшими значениями M_r в популяции. Как мне кажется, ошибка авторов заключается в том, что они не учитывают существенного несоответствия между M_r и электрофоретической подвижностью в присутствии ДДС-Na, с определенностью установленного в случае щелочных белков (Panyim, Chalkley, 1971). Более того, известно, что погрешность определения M_r особенно велика в случае низкомолекулярных щелочных белков (Podulso, Rodbard, 1980). Так, для двух щелочных белковых компонентов миелина с $M_r = 18\,400$ и 14 300, выделенного из мозга крысы, с помощью электрофореза в ДДС-Na были получены значения 21 000 и 19 000 соответственно. Более того, если амфолиты плохо связывают или вообще не связывают ДДС-Na, что весьма вероятно для молекул небольшого размера, то очевидно, что плотность отрицательного заряда у щелочных амфолитов должна быть значительно меньше, чем у кислых. Это неизбежно должно проявиться в завышении кажущегося значения M_r при электрофорезе.

Данные по определению молекулярной массы амфолитов тонкослойной гель-фильтрацией на биогеле Р-10 (Goerth, Radola, 1980) в 25 мM фосфатном буфере, pH 7,2, в 2 M мочевине труднее поддаются интерпретации. Единственное объяснение завышению значений M_r, которые были получены этим методом, как мне кажется, заключается в возможности образования агрегатов различного состава из-за взаимодействия между компонентами, входящими в состав амфолитов. Недавно в работе Gianazza et al., 1979a, было прямо показано, что процесс ИЭФ амфолинов сопровождается образованием агрегатов, для разрушения которых необходимо вводить в систему 8 M мочевину. В этой же работе было установлено, что молекулы щелочных амфолитов способны связывать значительно больше неионных детергентов типа нонидета NP-40, чем кислые. Это означает, что щелочные амфолиты более гидрофобны. Склонность амфолитов к агрегации была выявлена и при помощи гель-фильтрации (Gelsema et al., 1980a). Степень агрегации амфолинов (LKB) заметно возрастает при повышении их концентрации от 0,6 до 4%. На основании анализа хроматографического поведения при гель-фильтрации был также сделан вывод о том, что амфолины широкого диапазона ($3{,}5 < pI < 10$) состоят главным образом из компонентов, производных ограниченного набора изомерных полиаминов, вероятно аналогов ПЭГА. При исследовании фармалитов эти же авторы обнаружили, что в препаратах, выпускавшихся вплоть до конца 1979 г., содержались вы-

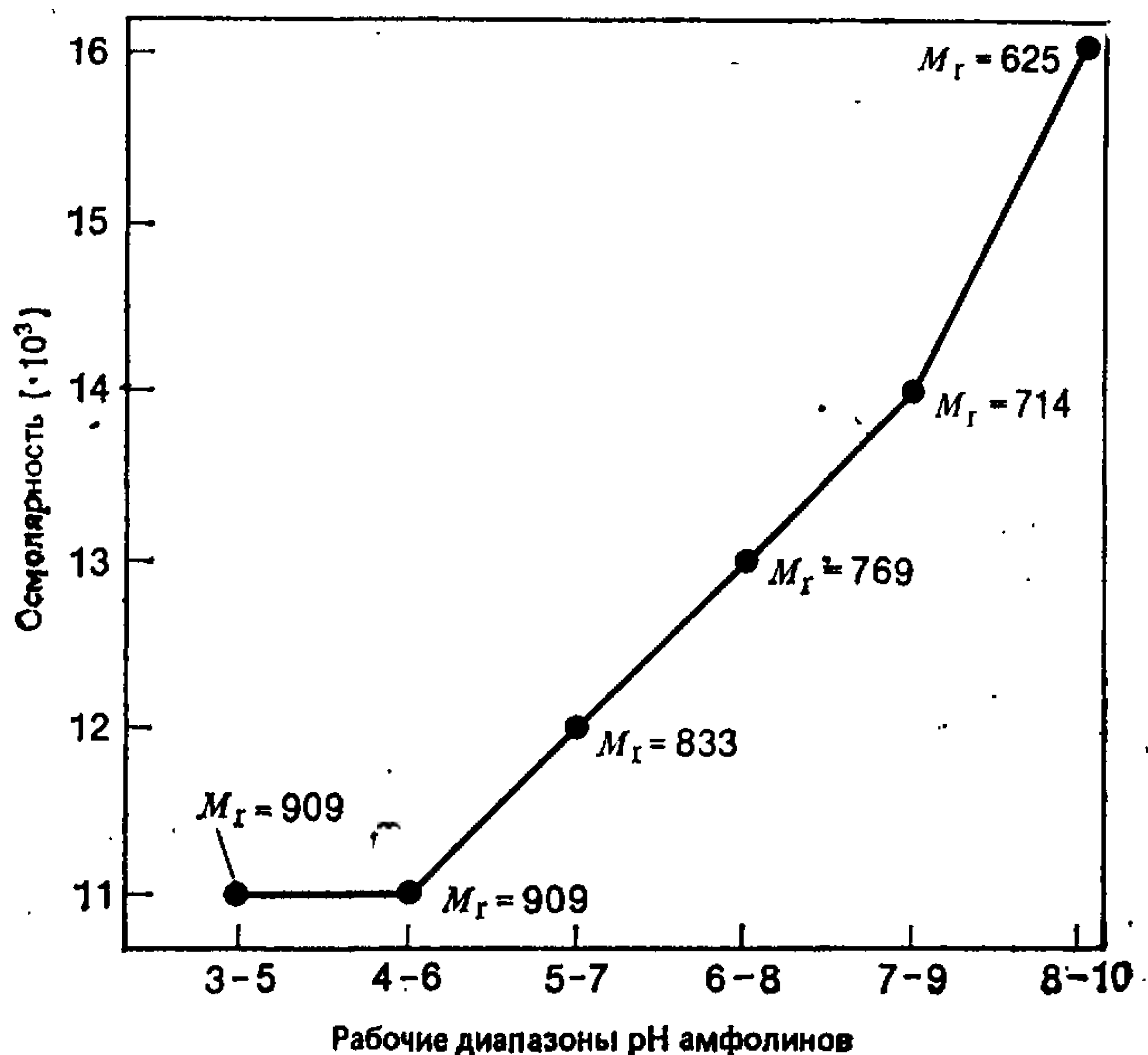


Рис. 1.19. Определение средней молекулярной массы M_r амфолинов узких диапазонов pH на основании данных по измерению осмолярности. Данные получены при работе с 1%-ными растворами амфолинов, рабочие диапазоны pH которых указаны по оси абсцисс. (Bianchi Bosisio et al., 1981.)

сокомолекулярные компоненты. Наибольшее содержание таких компонентов, выходящих в свободном объеме при гель-фильтрации на колонке с биогелем Р-4, отмечалось для фармалитов pH 5—8. По-видимому, начиная с 1980 г. высокомолекулярные компоненты были исключены из состава поступающих в продажу препаратов фармалитов.

До недавнего времени данные об M_r для амфолитов-носителей какого-либо определенного диапазона pH отсутствовали. Однако в работе Bianchi Bosisio et al., 1981, при помощи осмометрического анализа разбавленных растворов амфолитов, который, по мнению авторов, является наиболее совершенным методом определения молекулярной массы, были найдены средние значения M_r для амфолинов всех узких диапазонов pH. Эти данные представлены на рис. 1.19 и свидетельствуют о том, что масса амфолинов возрастает от минимального значения 625 для щелочных компонентов (pH 8—10) до 910 для кислых компонентов (pH 3,5—5). Амфолины двух крайних диапазонов (pH 2,5—4 и, вероятно, pH 9—11) характеризуются значительно меньшей молекулярной массой (M_r=325). Это подтверждает

сделанное ранее предположение (Gelsema et al., 1980a) о том, что они не принадлежат к «семейству» производных типа ПЭГА—акриловая кислота. Таким образом, амфолины, по всей видимости, не содержат компонентов с $M_r > 1000$. К сожалению, в случае фармалитов подобные эксперименты не могут быть проведены, поскольку неизвестна их истинная концентрация в растворе (фирма указывает только электропроводность для каждого диапазона pH).

1.10.4. Оптические свойства

Большинство компонентов, входящих в состав амфолинов, характеризуются незначительным поглощением при 280 нм, что весьма удобно для регистрации белков после фракционирования. Наиболее сильно в ультрафиолетовой области поглощают амфолины с низкими значениями pI. Следует отметить, что в тех случаях, когда регистрация поглощения производится не во фракциях, полученных после ИЭФ в градиенте плотности, а непосредственно сканированием колонки или геля в процессе ИЭФ, локальное поглощение того или иного сфокусированного амфолита может оказаться весьма значительным (Righetti, Drysdale, 1971; Catsimpoolas, 1973c).

При спектральном исследовании амфолинов различных диапазонов pH было установлено, что большинство из них имеет спектр поглощения с максимумом вблизи 365 нм (Righetti et al., 1975b). Амфолины диапазона pH 9—11 имеют дополнительный максимум при 290 нм, а амфолины диапазона pH 3,5—5 сильно поглощают при 310 нм. Кислые амфолины помимо заметного УФ-поглощения отличаются также более интенсивной желтой окраской. Спектры поглощения и флуоресценции некоторых хромофорных групп амфолитов (преимущественно кислого диапазона) зависят от pH.

Характерные особенности спектров амфолинов связывали с гетероциклическими азотсодержащими компонентами (Vinogradov et al., 1973; Righetti, Drysdale., 1974). Однако присутствие подобных компонентов не удалось выявить методом ЯМР-спектроскопии (Righetti et al., 1975a).

Выпускаемые в настоящее время амфолины не дают спектров дисперсии оптического вращения, что вполне согласуется с их химической структурой. В препаратах крайних диапазонов pH, выпускавшихся до 1970 г., содержались компоненты, обладающие способностью поворачивать плоскость поляризации света (Righetti et al., 1975b). Обнаруженная оптическая активность скорее всего была связана с добавками аминокислот — Glu и Asp (в кислом диапазоне pH), Lys и Arg (в щелочном диапазоне pH). Присутствие свободных аминокислот отмечалось

также в работе Davies, 1970, и было подтверждено аминокислотным анализом (Earland, Ramsden, 1969). После 1972 г. в поступающие в продажу амфолины перестали добавлять свободные аминокислоты (Haglund, 1975).

Литературные данные об оптических свойствах сервалитов и фармалитов весьма ограниченны. Они очень слабо поглощают при 280 нм, что позволяет проводить прямое сканирование фракционируемых белков. В работе Williams, Söderberg, 1979, приведены профили поглощения при 280 нм сфокусированных фармалитов диапазонов pH 4—6,5; 5—8; 3—10. Наибольшие значения A_{280} характерны для наиболее кислых компонентов внутри каждого из диапазонов. В диапазоне pH 4—6,5 поглощение отдельных пиков достигает 0,8.

Известно, что амфолины, сервалиты и фармалиты флуоресцируют при возбуждении светом с длиной волны 254 и 365 нм (Bonitati, 1980, 1981). Наиболее интенсивной флуоресценцией характеризуются сервалиты. Эта их особенность была использована для построения профилей распределения амфолитов и локализации белковых зон после ИЭФ (см. также разд. 1.8).

1.10.5. Буферная емкость и электропроводность амфолинов, сервалитов и фармалитов

В литературе можно найти подробные сведения об амфолинах фирмы LKB (Davies, 1970; Haglund, 1975; Fawcett, 1975a), а также об их аналогах, синтезированных в лаборатории (Righetti et al., 1975a, 1977). Кроме того, были опубликованы результаты сравнительного изучения амфолинов и сервалитов (Fredriksson, 1977a), а также всех трех типов коммерческих амфолитов-носителей (Gelsema et al., 1978). По данным Fredriksson, 1977 a, буферная емкость сервалитов pH 2—11 в области градиента при pH<8 в 1,5—2,5 раза ниже, чем емкость в соответствующей области амфолинов pH 3,5—10. При pH>8,5 оба типа амфолитов-носителей обладают одинаковой буферной емкостью. Для обоих градиентов минимальные значения емкости (5,2 мкэкв$\cdot$pH$^{-1}\cdot$мл$^{-1}$ для амфолинов и 1,8 мкэкв$\cdot$pH$^{-1}\cdot$мл$^{-1}$ — для сервалитов) обнаруживаются в районе pH 6,2. Эти данные, полученные при ИЭФ 1%-ных растворов в сахарозном градиенте плотности, хорошо согласуются со значением буферной емкости 6 мкэкв$\cdot$pH$^{-1}\cdot$мл$^{-1}$, определенным в работе Davies, 1970, для 1%-ного раствора амфолинов в интервале pH 5—7.

Результаты, полученные при сравнении трех типов поступающих в продажу амфолитов (Gelsema et al., 1978), можно считать наиболее достоверными, поскольку фокусирование в этом случае проводилось в свободной жидкости (без использования

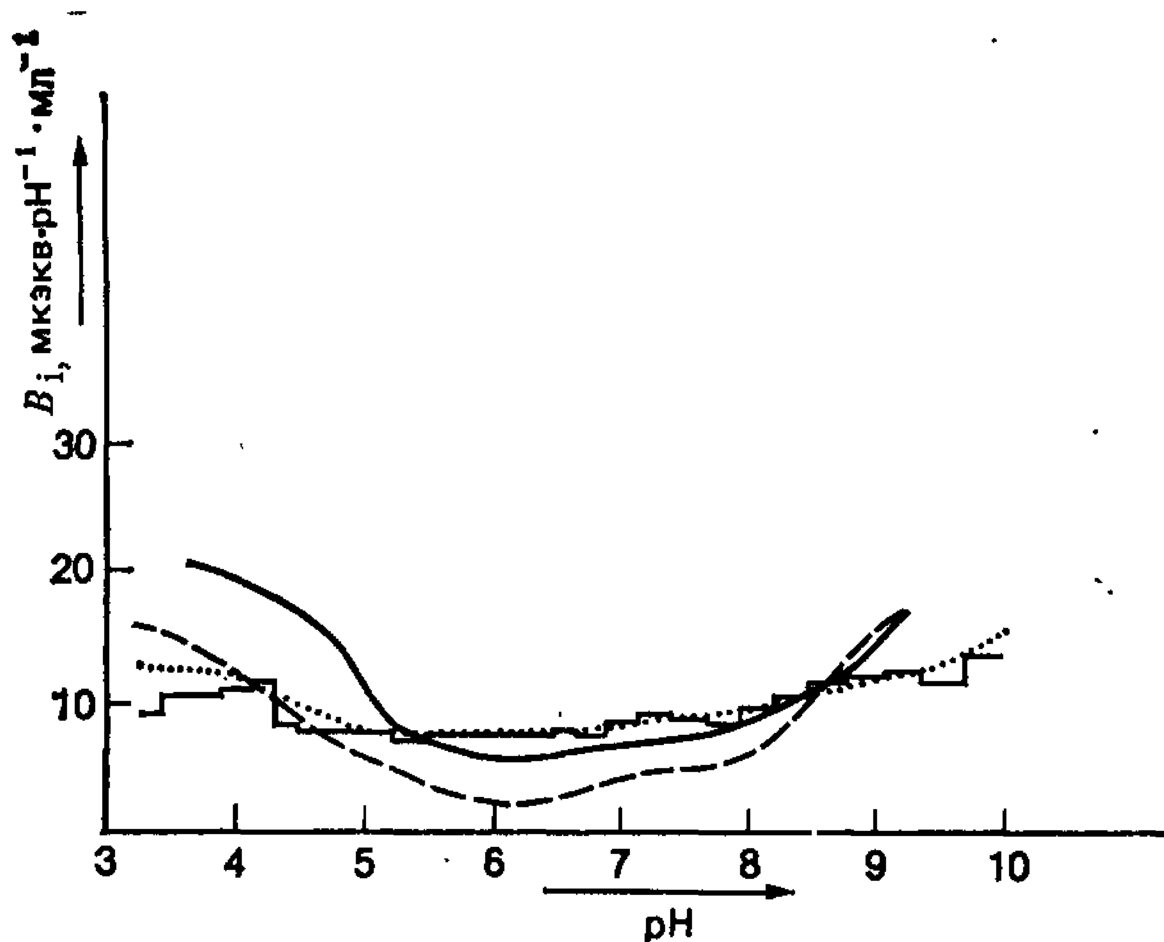


Рис. 1.20. Зависимость буферной емкости от pH в градиентах pH, полученных при фокусировании амфолинов (——), сервалитов (- - -) и фармалитов (···). Данные фирмы Pharmacia о буферной емкости фармалитов представлены ступенчатой линией. (Gelsema et al., 1978.)

сахарозного градиента) в спиральном полиэтиленовом капилляре (по Bours, 1976). Эти результаты представлены на рис. 1.20. Видно, что в области pH 5,5—8,2 фармалиты отличаются самой высокой и равномерной буферной емкостью. Наихудшие буферные свойства в этом диапазоне проявляют сервалиты. На участке градиента pH 3,5—5,5 наилучшими буферными свойствами обладают амфолины, а при pH>8,5 и амфолины, и сервалиты обладают более высокой буферной емкостью, чем фармалиты. На графике, приведенном на рис. 1.21, показана pH-зависимость отношения молярной буферной емкости (B_i) к электропроводности (χ_i) во фракциях, полученных после ИЭФ. Как известно,

$$\frac{B_i}{\chi_i} \simeq \sqrt[3]{M_r}, \quad (43)$$

а графический анализ показывает, что практически по всему градиенту pH, особенно на участке pH 5,5—8,5, это отношение достигает наибольших значений для фармалитов. Несколько меньшие значения характерны для амфолинов, еще меньшие — для сервалитов. Таким образом, эти три кривые согласуются с известным соотношением среднестатистических значений M_r коммерческих амфолитов-носителей: M_r (серв.) $<M_r$ (амф.) $<$ $<M_r$ (фар.). Возможно, наиболее благоприятные буферные свойства фармалитов в области pH 5,5—8,5 связаны с тем, что они обладают наибольшей молекулярной массой. Это согласует-

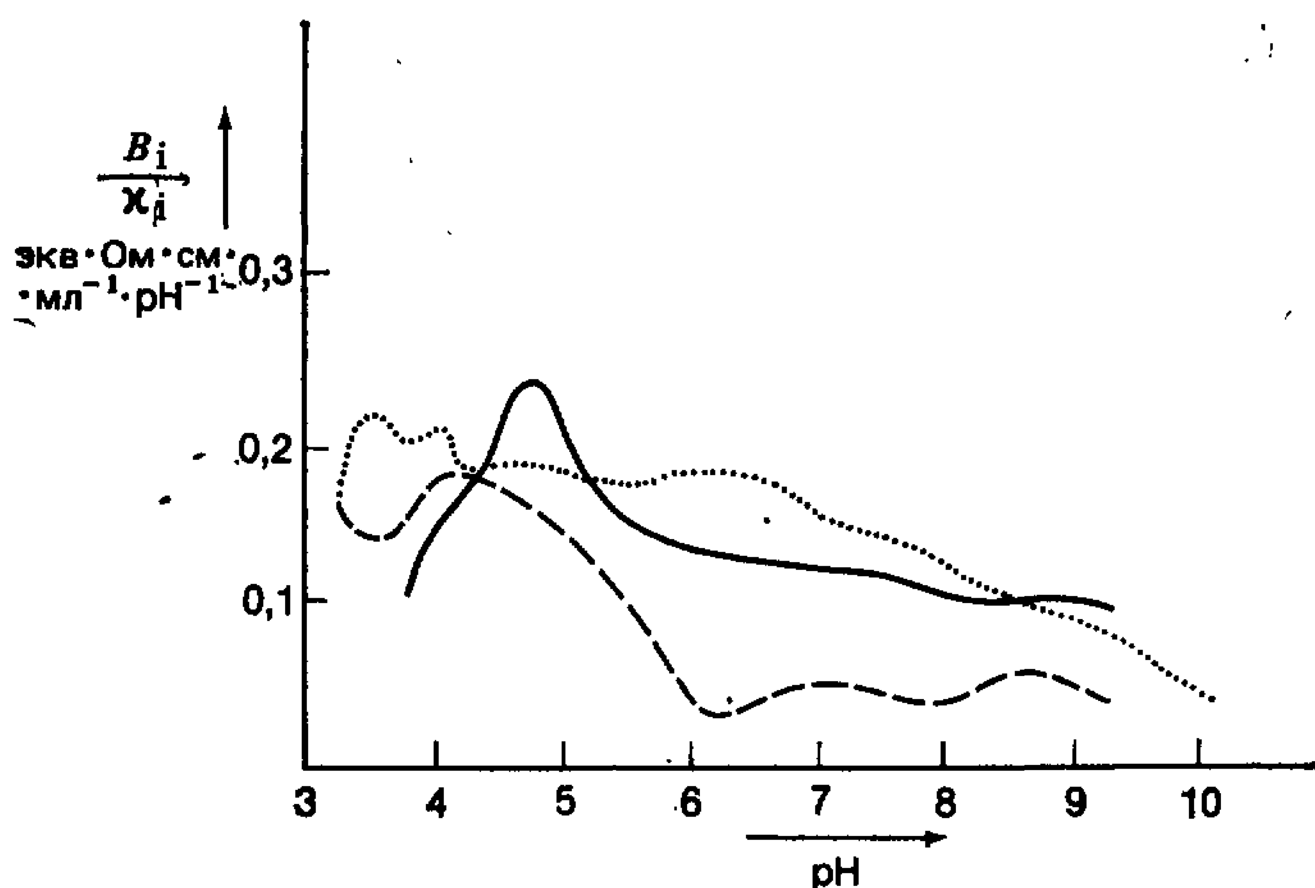


Рис. 1.21. Зависимость отношения B_i/χ_i от pH в градиентах pH, полученных при фокусировании амфолинов (——), сервалитов (- - - -) и фармалитов (····). B_i — молярная буферная емкость в изоэлектрическом состоянии, χ_i — электропроводность в изоэлектрическом состоянии. Отношение B_i/χ_i пропорционально кубическому корню из молекулярной массы. (Gelsema et al., 1978.)

ся с гипотезой, высказанной в работе Charlionet et al., 1981 о том, что фактором, ограничивающим разрешающую способность при ИЭФ, является M_r амфолитов, формирующих данный градиент pH. Такого рода сопоставление правомерно только в том случае, если амфолиты всех трех типов характеризуются примерно одинаковым относительным содержанием протолитических групп на единицу массы (см. также разд. 1.7.2 и 1.10.3).

Мне хочется привести еще одно сопоставление. Как мы видели ранее, у фармалитов наблюдались наиболее высокие и равномерно распределенные значения буферной емкости во всем интервале pH 5—8 и отсутствовал характерный минимум электропроводности при pH около 6,2. О достаточно высокой молекулярной массе компонентов диапазона pH 5—8 свидетельствовало то, что при гель-фильтрации на биогеле P-4 они элюировались со свободным объемом (Gelsema et al., 1980a). С другой стороны, как отмечалось в разд. 1.10.3, начиная с 1980 г. фирма Pharmacia выпускает амфолиты с меньшими значениями M_r. Последние данные говорят о том, что новые фармалиты уже обнаруживают обычный минимум электропроводности (и соответственно буферной емкости) в районе pH 6—6,5. Я склонен полагать, что это обусловлено именно удалением высокомолекулярных компонентов. К сожалению, фирма-изготовитель, которая могла бы сообщить нам более точные сведения о своей продукции, предпочитает хранить молчание.

1.10.6. *Распределение амфолитов-носителей при фокусировании. Общее число индивидуальных компонентов*

Исходя из общего дифференциального уравнения ИЭФ (1), описывающего равновесие между электрофоретическим и диффузионным переносом массы в стационарном состоянии, Свенссон вывел уравнение для концентрации C амфолита, сфокусированного в линейном градиенте pH с неизменной удельной электропроводностью χ_0 (Svensson, 1961):

$$\left(\frac{C}{C_0}\right)_{\text{гауссово}} = \exp\left(-\frac{Pix^2}{2q\chi_0 D}\right). \quad (44)$$

Это — симметричное гауссово распределение, где i — сила тока, q — площадь поперечного сечения фокусирующей колонки, x — координата по направлению тока [$x=0$ в точке концентрационного максимума (c_0) амфолита, $x>0$ при отклонении от максимума в сторону катода], D — коэффициент диффузии амфолита. Величина P определяется уравнением (17). В случае, когда электропроводность не постоянна, а является линейной функцией координаты x, решение уравнения (1) принимает вид

$$\left(\frac{C}{C_0}\right)_{\text{искаженное}} = \exp\left[\frac{Pi\chi}{Dqr^2}\cdot\ln\left(1+\frac{rx}{\chi_0}\right)-\frac{Pi\chi}{Dqr}\right]. \quad (45)$$

Это распределение — асимметрично (r — ширина зоны). Таким образом, концентрационный профиль амфолитов вблизи изоточки может соответствовать гауссову или искаженному распределению. Несимметричное концентрационное распределение при ИЭФ было обнаружено для довольно многих амфолитов-носителей (Brown et al., 1977). С другой стороны, в работе Gelsema, De Ligny, 1979, утверждается, что даже сильные изменения электропроводности по длине фокусировочной колонки оказывают крайне малое влияние на концентрационное распределение амфолитов вблизи pI и, таким образом, едва ли могут быть причиной подобных искажений. Следовательно, наблюдаемое искаженное распределение скорее всего вызвано негомогенностью амфолита в данной области или взаимодействием его с компонентами фокусирующей системы, т. е. с другими амфолитами или составляющими антиконвекционной среды. Имеются определенные сведения и о взаимодействии амфолитов между собой и с другими веществами, особенно с нейтральными детергентами, такими, как нонидет NP-40 и твин 80, которые при ИЭФ добавляют для солюбилизации мембранных белков (Gianazza et al., 1979a).

Другой аспект проблемы, также обнаруживающий некоторые противоречия, связан с определением истинного линейного раз-

мера зоны индивидуального сфокусированного амфолита-носителя вдоль оси разделительной колонки. В работе Brown et al., 1977, высказано предположение о том, что в процессе фокусирования индивидуальные амфолиты распределяются в виде очень широких зон, протяженность которых составляет от 7 до 15% (преимущественно около 10%), а в отдельных случаях достигает 40% от полной длины пути разделения. В справедливости такой точки зрения можно усомниться, в частности, потому, что она основана на данных ионообменной хроматографии, разрешающая способность которой не позволяет обнаружить более 10—15% от общего числа индивидуальных компонентов, а также на данных по распределению гистидина, который в процессе ИЭФ при высокой загрузке агрегирует и преципитирует по всей длине колонки. С другой стороны, многочисленные данные по ИЭФ растительных пигментов (Jonsson, Pettersson, 1968), красителей (Righetti et al., 1977b), свободных аминокислот (Catsimpoolas, 1973c), пептидов (Righetti, Chillemi, 1978), а также результаты прямой регистрации картины распределения амфолитов по изменению показателя преломления (Righetti et al., 1975a; Rilbe, 1973b) или с помощью специальных красителей (Radola et al., 1977) показывают, что даже низкомолекулярные амфолиты фокусируются в виде очень узких зон. Несмотря на значительно более высокие, чем у белков, коэффициенты диффузии, амфолиты-носители образуют зоны, ширина которых, как правило (особенно при загрузках порядка нескольких микрограммов), составляет от 0,1 до 0,5% длины колонки (Righetti, 1977). В щелочной области градиента ситуация может быть несколько иной, поскольку, как было показано в работе Gianazza et al., 1979a, эта область характеризуется повышенным содержанием «плохих» амфолитов-носителей. Распределение таких амфолитов вблизи изоточки может быть более диффузным.

Наконец, еще один, последний аспект проблемы связан с общим числом индивидуальных компонентов, входящих в состав каждого из трех видов коммерческих амфолитов-носителей. По оценкам Вестерберга, предложенный им способ синтеза позволяет получить более 360 изомеров и гомологов (Vesterberg, 1973c). Это число можно увеличить, проводя дополнительно метилирование или этилирование аминогрупп. С помощью ионообменной хроматографии амфолинов pH 3,5—10 (фирмы LKB) удалось обнаружить только 62 разных компонента (Brown et al., 1976). С другой стороны, при регистрации распределения амфолитов с помощью формальдегида, лактозы или нингидрина после ИЭФ в слое сефадекса G-75 только в рамках диапазона шириной в 2 ед. pH было отмечено около 150 различных компонентов (Radola et al., 1977). Кроме того, ионообменная хроматография амфолинов узкого диапазона (0,5 ед. pH) позволи-

ла обнаружить до 45 пиков. Судя по этим данным, амфолины pH 3,5—10 должны содержать не менее 500 индивидуальных амфолитов. Действительно, по свидетельству многих авторов и фирм-изготовителей, общее число компонентов в препаратах амфолитов-носителей очень велико. Так, в работе Söderberg et al., 1980, утверждается, что фармалиты содержат не менее 1000 различных компонентов на 1 ед. pH. Это означает, что фармалиты широкого диапазона pH представляют собой необычайно гетерогенную смесь более чем 6000 амфолитов. Если и это кому-нибудь покажется недостаточным, то можно вспомнить, что, согласно расчетам Charlionet et al., 1981, предложенный ими способ синтеза позволяет получать амфолиты, которые только в диапазоне pH 4,3—5,0 (т. е. шириной всего 0,7 ед. pH) содержат более 4000 компонентов с разными значениями pI и p*K*. Здесь, пожалуй, следует поставить точку, пока числа еще не достигли подлинно астрономических масштабов.

1.10.7. Хелатирующие свойства

О том, что амфолиты-носители способны хелатировать ионы металлов, известно уже давно (Davies, 1970), однако количественные характеристики этого явления долгое время оставались неизученными. Было найдено, что в образовании комплекса с ионами металлов участвуют обычно две соседние азотсодержащие функциональные группы амфолитов, при этом образуются пятичленные циклы (Galante et al., 1975). Оптимум хелатообразования находится в области pH 8,5—10,5, где многие аминогруппы депротонированы. Формирование комплексов смешанного типа по азоту и карбоксильной группе хотя и возможно, но менее выгодно, поскольку образующийся при этом семичленный цикл менее стабилен. Хелатообразование с участием только одних карбоксильных групп, т. е. с образованием двенадцатичленных циклов, маловероятно.

Хелатирующие свойства по отношению к большинству ионов металлов у амфолинов выражены слабее, чем у ЭДТА. Для образования комплекса с двухвалентными катионами типа Mg^{2+}, Ca^{2+}, Zn^{2+} (за исключением Cu^{2+}) требуется, как правило, (100—500)-кратный молярный избыток амфолитов, в то время как ЭДТА обычно связывает металлы в диапазоне pH 3—11 при молярном соотношении 1 : 1. По отношению к ионам Cu^{2+} амфолиты-носители, так же как и ЭДТА, являются сильными хелатирующими агентами. Поэтому ИЭФ многих медьсодержащих белков может сопровождаться их быстрой инактивацией.

Недавно мне удалось найти в химической литературе данные, которые ранее нам не были известны, но которые полностью подтверждают полученные нами результаты. Так, согласно

Таблица 1.5. Константы связывания для стехнометрических (1 : 1) комплексов тетраминов с нонами меди (II)[1]

Лиганды	Логарифм константы связывания, л/моль	Температура, °C
	Макроциклические	
Голубой комплекс	20	25
Красный комплекс	28	25
	Ациклические	
$N[(CH_2)_3NH_2]_3$	13,1	25
$NH_2(CH_2)_3NH(CH_2)_2NH(CH_2)_3NH_2$	17,3	20
$N[(CH_2)_2NH_2]_3$	18,8	20
$NH_2(CH_2)_2NH(CH_2)_2NH(CH_2)_2NH_2$	20,1	25
$NH_2(CH_2)_2NH(CH_2)_3NH(CH_2)_2NH_2$	23,9	25

[1] По Christensen et al., 1971.

Christensen et al., 1971, линейные, разветвленные или циклические полиамины действительно являются сильными комплексонами по отношению к ионам Cu^{2+}. В табл. 1.5 приведены значения логарифма константы связывания меди для набора тетраминов различной структуры. Считают, что в случае циклических тетраминов ион меди точно входит внутрь кольца так, что четыре более или менее эквивалентных атома азота координируются в одной плоскости вокруг центрального катиона Cu^{2+}. Все рассматриваемые полиамины образуют с медью стехиометрические комплексы с молярным соотношением 1 : 1. Необходимо отметить, что структура вестерберговых амфолитов-носителей, в которых атомы азота, как правило, разделены двумя метиленовыми звеньями, является оптимальной для связывания ионов меди. Как видно из табл. 1.5, соединения этого типа характеризуются значительно более высоким сродством к металлу, чем соответствующие гомологи, в которых между атомами азота находится цепочка из трех углеродных атомов. На сегодняшний день в литературе отсутствуют сведения о хелатирующих свойствах сервалитов или фармалитов.

Для сведения к минимуму связывания ионов металлов при ИЭФ белки следует вносить таким образом, чтобы их миграция происходила от анода к катоду. С этой же целью имеет смысл вносить разделяемые белки в сформированный заранее градиент pH, что позволит уменьшить время их контакта с амфолитами. Наиболее безопасным способом можно считать внесение белка максимально близко к области его pI. К счастью, инактивация

фермента за счет удаления металла редко бывает необратимой. Как правило, удается полностью восстановить ферментативную активность, проводя после ИЭФ инкубацию с необходимым количеством утраченного кофактора. Наиболее существенная проблема, возникающая в связи с хелатирующими свойствами амфолитов, заключается в образовании дополнительных зон, которые соответствуют множественным формам белка с различным содержанием металла.

1.10.8. Биологическая токсичность

Эксперименты на животных и изучение цитотоксического эффекта in vitro показали, что амфолины относительно безвредны (Wadström et al., 1974). Присутствие амфолинов не искажает результаты тестов, основанных на иммунодиффузии или ингибировании гемагглютинации. Амфолины с успехом применяли для поддержания pH при работе с культурами тканей (Walther, Schubert, 1974). Поскольку амфолины можно легко отделить от очищенных белков и нет четких указаний на образование между ними прочных комплексов, представляется перспективным использовать амфолины для препаративного получения методом ИЭФ или ИТФ белков, предназначенных для использования в медицине или ветеринарии.

Тем не менее в случае культуры тканей ситуация может быть несколько иной. Так, в опытах Gierthy et al., 1979, с культурами неделящихся диплоидных фибробластов из легких человека амфолиты проявляли митогенную активность. Особенно высока активность амфолинов (фирмы LKB) pH 9—11. Их стимулирующий эффект достигал 30—50% от величины максимального ответа, получаемого при стимуляции фактором из тромбоцитов человека. Амфолиты других марок, включая физолиты (поставляются фирмой Brinkmann), сервалиты и фармалиты, не обнаруживают существенной митогенной активности. Однако любые амфолиты-носители в высокой концентрации (выше 2—3 мг/мл) подавляют рост клеток и обладают цитотоксичностью.

Следует отметить, что если приводимые в цитируемой работе данные по биологической активности амфолитов представляются достоверными, то сделанный там вывод о том, что как митогенные амфолины pH 9—11, так и немитогенные физолиты pH 9—11, фармалиты pH 8—10,5 и сервалиты pH 4—9 содержат высокомолекулярные компоненты (M_r=5000—7000), по всей видимости, ошибочен. Как было отмечено в разд. 1.10.3, амфолины крайних диапазонов pH (2,5—4 и 9—11) на самом деле характеризуются меньшими значениями M_r (около 300—400), чем компоненты с буферными свойствами в интервале pH 4—9 (Bianchi Bosisio et al., 1981; Gelsema et al., 1979).

1.10.9. Растворимость амфолитов-носителей в различных растворителях

Амфолиты-носители растворимы в присутствии большинства агентов, преципитирующих белки, таких, как сульфосалициловая кислота или ТХУ. Преципитация амфолитов не происходит при повышении концентрации ТХУ по крайней мере до 50% (Radola, 1980 b). Имеющиеся в продаже амфолиты всех типов и всех диапазонов pH при комнатной температуре осаждаются 0,6%-ной пикриновой кислотой, вероятно, в результате образования специфических комплексов (неопубликованные результаты экспериментов, проведенных совместно с A. Görg, W. Postel и R. Westermeier). Амфолины фирмы LKB растворимы в насыщенном растворе сульфата аммония, т. е. в условиях, которые вызывают обратимую преципитацию большинства белков Nilsson et al., 1970). Они также растворимы (по крайней мере до 2%-ной концентрации) в 100%-ном хлоральгидрате — растворителе, применявшемся для электрофореза белков (Ballou et al., 1974). Однако амфолиты, судя по всему, модифицируются этим альдегидом, вероятно, с образованием шиффовых оснований (Brenna et al., 1982). К сожалению, этот растворитель непригоден для ИЭФ, поскольку при pH>5 он очень активно взаимодействует с белками. Амфолиты хорошо растворимы в 100%-ном формамиде, традиционном растворителе для электрофореза ДНК и РНК (Rickwood, Hames, 1981). Тем не менее при ИЭФ в этом растворителе также не удается получить воспроизводимые результаты, так как формамид активно гидролизуется вблизи катода с образованием муравьиной кислоты и свободного аммиака, которые дестабилизируют градиент pH. Гидролиз не удается подавить, даже используя слабые католиты, например разбавленный раствор триса (неопубликованные данные, полученные совместно с E. Gianazza). Недавно мы приступили к систематическому изучению растворимости амфолинов в присутствии различных органических растворителей, в основном спиртов, и типичных дезагрегирующих агентов, таких, как диметилсульфоксид (ДМСО), диметилформамид (ДМФ) и тетраметилмочевина (ТММ). Было бы очень заманчиво заменить 8 М или 9 М мочевину при ИЭФ на какой-либо из этих растворителей, поскольку, как известно, присутствие мочевины в системе приводит к pH-зависимому карбамилированию белков. Так, запасные белки злаков (проламины) хорошо растворяются в спиртах, например изопропаноле, который мог бы послужить идеальным заменителем мочевины при изоэлектрическом фракционировании этих белков.

В табл. 1.6 указана растворимость амфолинов (диапазона pH 3,5—10) в различных водно-органических смесях. Приведен-

Таблица 1.6. Растворимость амфолитов-носителей в различных водно-органических смесях и в растворе сульфата аммония

Компонент смеси	Концентрация	Растворимость амфолинов (22 °С, 2%-ные амфолины pH 3,5—10)
Сульфосалициловая кислота	До 5%[1]	Полиостью растворимы
Трихлоруксусная кислота	До 50%[1]	То же
Пикриновая кислота	0,6%	Осаждаются
Сульфат аммония	Насыщенный раствор	Полностью растворимы
Хлоральгидрат	До 100%	То же
Формамид	До 100%	Растворимы
Сульфолан	До 85%	»
Этанол	До 70%	»
Диметилсульфоксид	До 65%	»
Диметилформамид	До 55%	»
Изопропанол	До 50%	»
Тетраметилмочевина	До 45%	»

[1]) В смесях с более высокой концентрацией кислоты растворимость амфолинов не проверяли.

ные данные относятся к 2%-ному раствору амфолинов (в г/100 мл раствора) при комнатной температуре (22°С) в отсутствие электрического поля. Можно полагать, что в условиях ИЭФ растворимость амфолинов будет несколько ниже, поскольку при этом все компоненты окажутся практически лишенными заряда.

1.10.10. *Регенерация амфолитов-носителей*

Возможность регенерации и повторного использования амфолитов-носителей, особенно после препаративного ИЭФ, имеет важное практическое значение. С этой целью было предложено использовать диализ (обычный или с применением полых волокон), гель-фильтрацию, высаливание, ионообменную хроматографию и электрофорез (Vesterberg, 1976; Callahan et al., 1976). В работе Goerth, Radola, 1980, для выделения амфолитов-носителей была использована ультрафильтрация через мембраны (производства Amicon и Kalle), изготовленные из ацетата целлюлозы, полиамида или других синтетических полимеров. Предложенная методика включала две стадии; на первой проводилась ультрафильтрация через мембраны, задерживающие молекулы с M_r=5000—20 000, на второй — через мембраны, задерживающие молекулы с M_r=500—5000. Таким способом в две стадии с достаточно высокой скоростью можно регенерировать

амфолиты-носители различных марок. Следует отметить, что полное отделение амфолитов от сфокусированного белка происходит только при ультрафильтрации через наиболее крупнопористую мембрану полиамидного типа (PA 20 фирмы Kalle). Склонность к задерживанию на мембране увеличивается в следующем ряду: сервалиты<амфолины<фармалиты. На этом основании в работе Goerth, Radola, 1980, был сделан вывод о том, что амфолины и фармалиты характеризуются более высокими значениями M_r. Впрочем, последние данные (Bianchi Bosisio et al., 1981; Gelsema et al., 1980 a) указывают, что амфолиты этих марок скорее всего просто более склонны к агрегации (разд. 1.10.3). Интересно, что регенерация, судя по всему, улучшает свойства амфолитов-носителей — они становятся более однородными по размеру, уменьшается катодный дрейф при ИЭФ.

1.11. Альтернативные способы формирования градиента pH

В этом разделе будут рассмотрены некоторые другие методы, позволяющие получать градиент pH, в принципе пригодный для ИЭФ. Некоторые из этих методов представляют главным образом теоретический интерес, другие, как утверждается, могут использоваться для изоэлектрического фракционирования.

1.11.1 Амфолиты-носители на основе бактопептона

В работе Blanicky, Pihar, 1972, описано получение амфолитов из бактопептона. После удаления белков осаждением 60%-ным этанолом получали смесь, состоящую, вероятно, из нескольких десятков различных пептидов, пригодную для проведения ИЭФ. Электропроводность и буферную емкость смеси в нейтральной области повышали добавлением гистидина. Амфолиты-носители этого типа аналогичны амфолитам, описанным в работе Vesterberg, Svensson, 1966, и обладают, по всей видимости, теми же недостатками. Подобный подход был использован также в работе Molnarova, Sova, 1974, где с помощью казеинового гидролизата удалось получить хороший градиент pH в кислой области, начиная с pH 2,5.

1.11.2. Тепловой градиент pH

Принципиально иной подход к формированию градиента pH, не связанный ни с использованием амфолитов-носителей, ни с длительным электролизом, опирается на зависимость pH буфера и pI разделяемых белков от температуры (Kolin, 1970; Luner,

Kolin, 1970, 1972; Lundhal, Hjertén, 1973). Градиент pH, основанный на температурной зависимости pK буфера, устанавливается за несколько секунд. С помощью температурного градиента удается получить градиент pH на участке протяженностью около 1 ед. pH. Форма градиента легко регулируется изменением перепада температур. Преимущества данного метода заключаются в том, что отпадает необходимость в проведении длительного стационарного электролиза и использовании амфолитов-носителей, которые после ИЭФ нужно каким-то образом отделять от белков.

В качестве примера рассмотрим равновесие в системе буфера трис-HCl, которое определяет его pH:

$$K = [H^+]\,[\text{Трис}]/[\text{Трис}—H^+]. \quad (46)$$

Температурная зависимость активности протонов (a_H) буферного раствора может быть выражена как

$$\partial p\alpha_H/\partial T \approx -(\partial \log K/\partial T)-(2z+1)\,(\partial \log \gamma/\partial T), \quad (47)$$

где γ — типичный коэффициент активности иона с валентностью $z=1$. В случае трис-буфера второй член в правой части уравнения (47) по величине составляет не более 10% от первого члена, следовательно, в первом приближении им можно пренебречь. Первый член ($\partial \ln K/\partial T$) можно выразить через молярную теплоту диссоциации кислоты (ΔH^0) и универсальную газовую постоянную (R):

$$(\partial \ln K/\partial T) = (\Delta H^0/RT^2). \quad (48)$$

Таким образом,

$$(\partial p\alpha_H/\partial T) \approx (\Delta H^0/RT^2). \quad (49)$$

Однако следует учитывать, что температура влияет не только на pH буфера, но и на pI фокусируемого белка. Фокусирование может происходить только в том случае, когда $(\partial pH/\partial T)_{буф}$— $(\partial pI/\partial T)_{бел} \neq 0$. На практике, однако, подобные градиенты pH трудно использовать для ИЭФ, поскольку различия в температурных коэффициентах для pH обычных буферов и для pI белков оказываются недостаточно велики. Более того, как правило, значение $\partial pH/\partial T$ для большинства буферных растворов слишком мало для того, чтобы сформировать эффективный градиент pH. Так, для фосфатного буфера $\partial pH/\partial T = -0{,}003$. Это означает, что при температурном градиенте от 0 до 100 °C (что достаточно для денатурации многих, если не всех, белков) градиент pH в разделительной колонке будет составлять только 0,3 ед. pH. Один из немногих пригодных буферов — это трис, для которого $\partial pH/\partial T = -0{,}028$, т. е. существенно выше, чем для большинства обычных буферных растворов.

1.11.3. Градиенты pH, возникающие при изменении диэлектрической проницаемости среды и на границе раздела фаз

В работе Troitzki et al., 1974, 1975, описано образование градиента pH с помощью обычных буферов в градиенте концентрации водно-органических смесей, содержащих этанол, диоксан, глицерин; маннитол, сахарозу или сорбитол. Опираясь на изменения pH в зависимости от содержания органического компонента, удавалось получать градиенты протяженностью приблизительно в 1,5 ед. pH на различных участках шкалы pH. Градиенты этого типа были стабильны при ИЭФ в течение по крайней мере 12 сут и при напряжении до 1000 В. Было проведено разделение гемоглобинов кролика в интервале pH 7—8,6, образованном боратным буфером в присутствии градиента концентрации сахарозы 0—30% на 0,5%-ном глицерине, а также фракционирование сывороточного альбумина человека в интервале pH 4,5—5,8 на основе ацетатного буфера в присутствии градиента концентрации глицерина 0—90%.

На самом деле использовать градиенты такого типа было предложено еще в работе Lundahl, Hjertén, 1973, где отмечалось, что при прохождении тока через растворы, содержащие градиент концентрации неэлектролитов, например сахарозы или даже акриламида (при градиентном электрофорезе), спонтанно образуется градиент pH. Эти же авторы отмечали скачкообразное изменение pH при переходе между буферным раствором и полиакриламидным гелем, возможно вследствие изменения числа переноса ионов на границе жидкая фаза/гель. На основании своих наблюдений они предложили интересное объяснение такому известному явлению, как возникновение δ- и ε-границ при электрофорезе в свободной фазе. По мнению авторов, эти границы стационарны и соответствуют скачкообразному изменению pH и электропроводности. Было предложено использовать аналогичные явления для формирования стационарных градиентов pH и проведения ИЭФ. Однако на сегодняшний день возможность использования методов, основанных как на изменении диэлектрической постоянной, так и на граничных эффектах, представляется практически неосуществимой. По своему опыту работы как с полиакриламидными гелями (неопубликованные данные, полученные совместно с B. Brost и R. S. Snyder), так и с растворами (неопубликованные данные, полученные совместно с M. Bier и N. Egen) могу отметить, что градиенты pH этого типа (которые в лучшем случае квазистационарны) или слишком круты, или слишком пологи для проведения ИЭФ.

1.11.4. Градиенты pH, образуемые вследствие диффузии буферов

Градиенты этого типа уже кратко обсуждались в разд. 1.1 и 1.5.1. Свенссон называл их «искусственными» градиентами pH, поскольку они образовывались вследствие диффузии буферов с разными pH и быстро разрушались под действием электрического поля. Разделяемую смесь помещали на границе между кислым и щелочным буферными растворами в приборе, аналогичном аппарату Тизелиуса. Градиент pH формировался благодаря диффузии в электрическом поле (Kolin, 1954, 1955 a, b, 1958). В такого рода «искусственных» градиентах pH Колину удавалось получить «изоэлектрические спектры» красителей, белков, клеток, бактерий и вирусов за времена от 40 с до нескольких минут, т. е. со скоростью, недостижимой для обычных электрофоретических методов. Этот же прием был использован для разделения сывороточных белков (Hoch, Barr, 1955) и гемоглобинов (Tuttle, 1956; Maher et al., 1956). Из-за плохой воспроизводимости и нестабильности метод не нашел применения и не использовался вплоть до 1979 г., когда был предложен его модифицированный вариант (Pollack, 1979). В этом варианте автор сделал еще один шаг вперед, отказавшись не только от амфолитов-носителей, но и вообще от каких-либо буферных растворов. Фокусирование проводилось в геле, содержащем только деионизованную воду между слабым католитом (обычно 0,1 М трис pH 9,5) и слабым анолитом (0,1 М уксусная кислота).

Можно ли считать это изоэлектрофокусированием? Несмотря на заверения автора, мне представляется,что в данном случае разделение сводится просто к распределению белковых зон на протяженных участках с практически нулевой электропроводностью. В самом деле, если градиент pH и образуется, то занимает не более 10% длины разделительной колонки. При этом к катодному и анодному участкам примыкают широкие области с постоянным pH (плато). Таким образом, в центральной части геля возникает ионный «вакуум», нечто вроде омута, в котором и происходит захват белковых ионов, неспособных к дальнейшей миграции. Аналогичное «псевдофокусирование» цитохрома *c* было обнаружено в работе Kolin, 1954, и тоже объяснялось возникновением своего рода «ловушки» с нулевой электропроводностью. В этой связи стоит вспомнить опыты по электролизу Na_2SO_4, которые проводились еще в начале 40-х годов Тизелиусом и Свенссоном (Rilbe, 1976). Так, было обнаружено, что в результате накопления H_2SO_4 у анода и NaOH у катода в средней части электролизера возникала область скачкообразного изменения pH. Действительно, согласно данным Pollack, 1979, присутствие всего лишь 1 мМ соли в католите или анолите ока-

зывается достаточным, чтобы предотвратить «псевдофокусирование» какого бы то ни было белка. Таким образом, даже незначительное повышение ионной силы среды позволяет белкам миновать вышеупомянутые «ловушки».

1.11.5. Градиенты pH, образуемые смесями кислот, оснований и амфолитов

Первые опыты, описанные в работе Pettersson, 1969, показали, что при фокусировании смеси амфолитов и кислот можно получить градиент в диапазоне pH 1—3. В этой работе использовали смесь шести кислот (№ 1, 2, 4, 6, 8 и 11 по табл. 1.7) и двух амфолитов — глутаминовой (pI 3,22) и аспарагиновой (pI 2,98) кислот. Было показано, что при действии электрического поля все компоненты распределяются в порядке возрастания их р*К*. При этом самая сильная кислота подходит ближе всех к аноду. Самая слабая кислота в той части своей зоны, которая ближе к аноду, практически не ионизирована.

С помощью такого градиента pH было осуществлено фракционирование пепсина (pI 2,5) и семи окрашенных компонентов (pI 1,3—3,1) из сока красной свеклы. Следует отметить, что используемый градиент pH имел ступенчатую форму. Аналогичный подход применялся в работе Stenman, Grasbeck, 1972, для фракционирования белков, связывающих витамин B_{12}. Для образования градиента использовали смесь восьми кислот (№ 3, 5, 7—12 по табл. 1.7) и тех же двух амфолитов. При фокусировании в глицериновом градиенте плотности при 400 В в течение 5 сут удавалось получить квазистационарный плавный градиент pH 1,5—4,5.

Недавно в серии публикаций группы Крамбаха (Nguyen, Chrambach, 1976; Nguyen, Chrambach, 1977 a, b, c; Nguyen et al., 1977 a, b; Caspers, Chrambach, 1977) было показано, что фокусирование можно аналогичным образом проводить в нейтральной и оснóвной областях pH. Авторы использовали смеси неамфотерных и амфотерных буферов, в том числе аминокислот. С помощью этого метода, названного «буферным электрофокусированием» (БЭФ), были исследованы особенности процессов образования и разрушения градиента pH при ИЭФ и проведено сравнение двух родственных методов разделения — ИЭФ и ИТФ. Полученные результаты можно суммировать следующим образом.

1. Обнаружено, что неамфотерные буферные вещества, помещенные в электрическое поле между кислым анолитом и щелочным католитом, могут формировать стабильный градиент pH. Это означает, что фокусирование, по сути дела, не является изоэлектрическим.

Таблица 1.7. Кислые и оснóвные буферы и амфолиты, используемые при БЭФ (Righetti, 1979)

Кислоты	pK	Основания	pK	Амфолиты	pK (аминогруппы)
Дихлоруксусная	1,48	Пиридин	5,5	MES	6,4
Фосфорная	2,12	4-Пиколин	6,2	ADA	6,6
Малоновая	2,18	Бис-трис	6,9	PIPES	6,8
Монохлоруксусная	2,84	Лютидин	7,0	BES	7,15
Молочная	3,08	Гидроксиэтилморфолин	7,2	MOPS	7,2
Лимонная	3,08	Имидазол	7,5	ACES	7,3
Малеиновая	3,45	N-этилморфолин	8,0	HEPES	7,55
Муравьиная	3,75	Триэтаноламин	8,4	TES	8,0
Янтарная	4,16	Трис	8,8	Трицин	8,6
Глутаровая	4,34	Моноэтаноламин	10,4	Бицин	8,7
Уксусная	4,75			Глицин	9,5
Пропионовая	4,85			Таурин	9,7
				GABA	11,3

Условные обозначения: MES — морфолиноэтансульфокислота; MOPS — морфолино-3-пропансульфокислота; ACES — (N-2-ацетамидо-2-аминоэтан)сульфокислота; TES — N-трис(гидроксиметил)метил-2-аминопропансульфонат; трицин — N-трис(гидроксиметил)метилглицин; бицин — N,N′-бис(2-гидроксиэтил)глицин; GABA — γ-аминомасляная кислота; ADA — N-2-ацетаминоиминодиуксусная кислота; BES — N,N′-бис(-2-гидроксиэтил)-2-аминоэтансульфокислота; HEPES — N-2-гидроксиэтилпиперазин-N′-2-этансульфокислота; PIPES — пиперазин-N,N′-бис(2-этан)сульфокислота; бис-трис — бис(2-гидроксиэтиламино-трис-гидроксиметил)-метан; трис — трис(гидроксиметил)аминометан.

2. Это в свою очередь указывает, что фокусирование сводится к равновесному распределению (т. е. к ИТФ) компонентов в порядке возрастания р*K* для неамфотерных соединений или в порядке возрастания pI для амфотерных соединений. То же самое происходит при замене буферов, используемых при ИТФ в качестве католита и анолита, на основание и кислоту. При этом образуется «кислотно-оснóвная клетка», которая и не позволяет разделяемым компонентам выйти за пределы колонки.

Таким образом, можно сделать два практических вывода.

а. Добиться стабилизации градиента pH при ИЭФ (в частности, против катодного дрейфа) можно, уравнивая pH анолита с pI наиболее кислого амфотерного компонента амфолинов данного диапазона pH. Так, при работе с амфолинами pH 6—8 стабилизация достигается при использовании треонина в качестве анолита и гистидина в качестве католита (Nguyen, Chrambach, 1977 b).

б. Систему ИТФ с многочисленными буферными компонентами можно легко превратить в систему ИЭФ, заменив ведущий и замыкающий компоненты на сильное основание и сильную кислоту. И наоборот, ИЭФ может фактически превратиться в ИТФ при замене электролитов на подходящие (ведущий и за-

мыкающий) буферные компоненты (Nguyen et al., 1977 a). Это может оказаться полезным для препаративного гелевого ИЭФ в электрофоретическом аппарате с камерой элюции.

Мне кажется, что проведение ИЭФ в градиентах такого типа имеет все-таки скорее теоретическое, чем практическое, значение. Кроме того, реальная степень сходства методов ИЭФ и ИТФ еще требует уточнения. Поскольку близость этих методов была установлена главным образом с помощью БЭФ, следует вспомнить, что, согласно теории Rilbe, 1976, при фокусировании неамфотерных буферов никогда не может быть достигнуто стационарное состояние. Слабые кислоты или основания даже после полной потери заряда и прекращения электрофоретической миграции будут диффундировать через слой сильной кислоты или сильного основания, который расположен со стороны анода или катода соответственно. Неясно также, в какой степени предложенный метод стабилизации градиента применим к различным диапазонам pH. Тем не менее добавление в систему амфотерных буферов, отличных от амфолинов, несомненно, может быть весьма полезным для формирования нелинейных градиентов, которые используются в новом методе — так называемом ИЭФ в модифицированном градиенте pH (разд. 4.4).

1.11.6. Градиент pH, образованный двумя-тремя амфолитами; моделирование при помощи ЭВМ

Все рассмотренные выше подходы к ИЭФ были чисто эмпирическими; им явно недоставало наглядной модели, которая описывала бы вклад индивидуальных компонентов в образование градиента. Только сравнительно недавно были опубликованы результаты блестящего теоретического и экспериментального исследования этого аспекта проблемы (Bier et al., 1981; Palusinski et al., 1981). Авторы исследовали градиенты pH, образуемые смесью всего двух-трех амфолитов с известными электрохимическими свойствами в зависимости от набора физических параметров разделения. Для описания системы необходимо знать следующие электрохимические характеристики амфолитов.

а. Коэффициенты подвижности (m) всех компонентов смеси. Должно быть известно не только значение m электрически нейтральной формы амфолита, но также подвижность катионной и анионной форм. Разница в значениях m для катиона и аниона может достигать 5%, например из-за более высокой степени гидратации карбоксильной группы (Edward, Waldron-Edward, 1965).

б. Константы диссоциации всех компонентов (pK). Для полиамфолитов — только значения pK, ближайшие к pI.

Таблица 1.8. Исходные параметры и результаты моделирования процесса ИЭФ бинарных систем амфолитов (Bier et al., 1981)

Компоненты системы	рK_1	рK_2	ΔрK	ΔрI	Коэффициент подвижности·10^4	Плотность тока, мА/см^2	Результат
β-Ala-His Arg	6,83 9,04	9,51 12,48	2,68 3,44	2,59	2,30 2,71	0,098	Хороший
β-Ala-His Orn	6,83 8,65	9,51 10,76	2,68 2,11	1,53	2,30 3,11	0,108	»
α-OH-Asn His-Gly	2,31 6,27	7,17 8,57	4,86 2,30	2,68	2,95 2,40	0,08	»
Asp *м*-АБК	1,88 3,12	3,65 4,74	1,90 1,62	0,98	2,97 3,01	0,40	»
α-Asp-His His	3,02 6,0	6,82 9,17	3,80 3,17	2,67	2,11 2,85	0,079	»
α-Asp-His IsoGln	3,02 3,81	6,82 7,88	3,80 4,07	0,93	2,11 2,96	0,25	Удовлетворительный
Gly Orn	2,35 8,65	9,78 10,76	7,43 2,11	3,63	4,11 3,11	0,10	Хороший
Gly-Gly β-Ala-His	3,15 6,83	8,25 9,51	5,10 2,68	2,47	3,08 2,30	0,08	»
His β-Ala-His	6,0 6,83	9,17 9,51	3,17 2,68	0,58	2,85 2,3	0,18	»
His His-His	6,0 6,8	9,17 7,8	3,17 1,0	0,30	2,85 1,49	0,384	Плохой
His Tyr-Arg	6,0 7,55	9,17 9,80	3,17 2,25	1,09	2,85 1,58	0,096	Хороший
His-Gly β-Ala-His	5,8 6,83	7,8 9,51	2,02 2,68	1,38	2,40 2,30	0,02	»
His-His β-Ala-His	6,8 6,83	7,8 9,51	1,0 2,68	0,89	2,40 2,30	0,30	Удовлетворительный
IsoGln His	3,02 6,0	6,82 9,17	4,07 3,17	1,74	2,96 2,85	0,09	Хороший
Gly-Gly-Gly His	3,23 6,0	8,09 9,17	4,86 3,17	1,94	2,59 2,85	0,076	»
Tyr-Arg Arg	7,55 9,04	9,80 12,48	2,25 3,44	2,08	1,58 2,71	0,079	»
Tyr-Arg Orn	7,55 8,65	9,80 10,76	2,25 2,11	1,02	1,58 3,11	0,108	»
Tyr-Tyr His	3,52 6,0	7,68 9,17	4,16 3,17	1,99	1,56 2,85	0,06	»

в. Изоэлектрические точки (pI) всех компонентов смеси. Из значений pI и pK получают значения параметров ΔpI и ΔpK, которые характеризуют качество разделения при ИЭФ (см. также Almgren, 1971). Система задается следующим набором физических параметров: а) размеры колонки (длина и площадь сечения); б) плотность тока (А/см²); в) начальные (исходные) концентрации амфолитов.

Если задать все эти характеристики и параметры, то с помощью компьютера можно получить: а) концентрационные профили (вдоль оси колонки) для всех ионных форм обоих амфолитов смеси; б) профили pH, электропроводности и электрического потенциала, а также некоторые другие дополнительные сведения.

В табл. 1.8 перечислены бинарные системы, которые позволяют проводить ИЭФ в диапазоне pH шириной в 1—2 ед. pH (Bier et al., 1981). На рис. 1.22 воспроизведены концентрационный и pH-профили, рассчитанные на ЭВМ для одной из систем — аспарагиновая кислота/*м*-аминобензойная кислота. Видно, что в этой системе формируются практически симметричный концен-

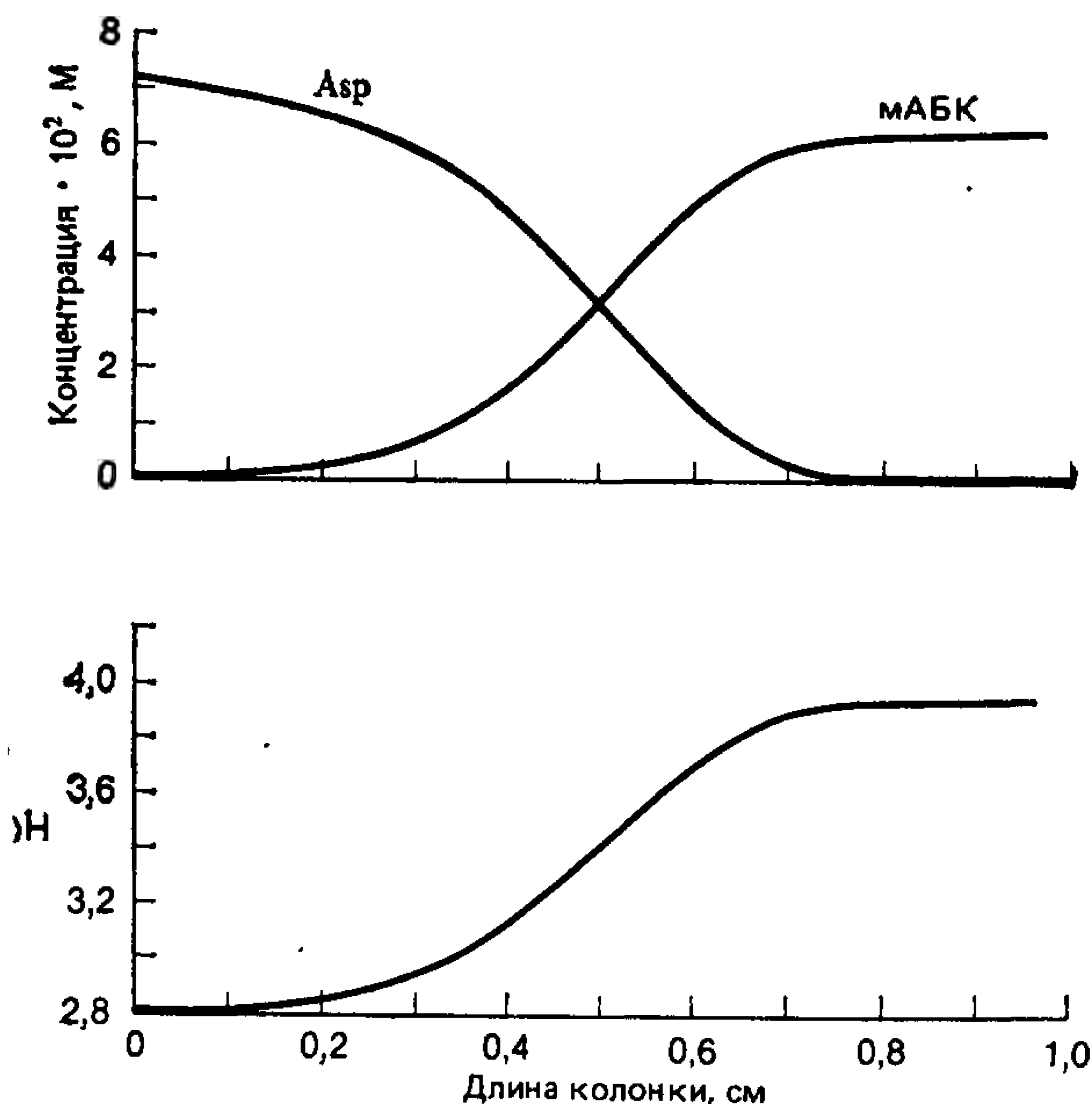


Рис. 1.22. Рассчитанные с помощью ЭВМ концентрационные и pH-профили, формирующиеся при фокусировании аспарагиновой кислоты (Asp; pI=2,95, ΔpK=1,91) и *м*-аминобензойной кислоты (мАБК; pI=3,93, ΔpK=1,62) при плотности тока 0,40 мА/см². Расчетное падение напряжения в колонке составляет 0,59 В. (Bier et al., 1981.)

трационный профиль и почти линейный градиент pH. Как ни странно, пара (His-His)/His, которая, казалось бы, может служить идеальной комбинацией, на самом деле не позволяет получить градиент pH, пригодный для ИЭФ. Наиболее важный вывод, который может быть сделан на основании подобных расчетов, заключается в том, что при ИЭФ в простых смесях амфолитов (вероятно, так же, как и в случае БЭФ) хороший градиент pH удается получить только при очень низком напряжении. Это означает, что фокусирование должно проводиться весьма продолжительное время. Так, фокусирование гемоглобина в системе (Gly-Gly-Gly)/His проводили в течение 6 сут при напряжении 0,5 В/см (ср. с напряжением 400 В/см в работе Radola et al., 1981). Уже при напряжении 2 В/см или выше фракционирование заметно ухудшается, так как распределение амфолитов перестает быть симметричным, зоны амфолитов значительно меньше перекрываются, образуется широкая область почти нулевой электропроводности, препятствующая миграции белков за ее пределы.

Данное исследование имеет фундаментальное значение для понимания сущности процессов фокусирования. Авторы отмечают, однако, что исследованные ими системы (как и системы БЭФ) определенно малопригодны для аналитического и даже для препаративного изоэлектрического фракционирования.

1.11.7. Иммобилизованные градиенты pH

Хотя в настоящее время данные о химически иммобилизованных градиентах pH в литературе отсутствуют, я не сомневаюсь, что именно этот подход ознаменует новый этап естественного развития метода. Исследования, проводимые в последние годы в нашей группе, были направлены на решение этой проблемы, главным образом в ее препаративном аспекте (Righetti, Gianazza, неопубликованные результаты). С другой стороны, недавно мне стало известно, что аналогичная методика уже запатентована (Rosengren et al., 1978, 1981).

Проследив ход развития теории ИЭФ от «искусственных» градиентов Колина через амфолиты-носители Свенссона вплоть до модельных бинарных систем Бьера, я понял, что иммобилизованные градиенты pH можно получать достаточно просто. Расчеты, выполненные в работе Bier et al., 1981, показали, что проведение ИЭФ в системе из двух амфолитов в принципе возможно, но нецелесообразно, поскольку даже при минимальном напряжении оба амфолита постепенно смещаются к соответствующим электродам, образуя обширную область низкой электропроводности и слишком крутой градиент pH. Это препятствует нормальному изоэлектрическому фракционированию белков.

Проблема может быть решена с помощью ИЭФ в химически иммобилизованном градиенте pH. Разработка и внедрение этого оригинального экспериментального подхода, судя по всему, окажется завершающим этапом, высшим достижением эволюции метода.

Возьмем обычный прибор для создания градиента. В смеситель нальем раствор, содержащий мономеры для получения полиакриламидного геля (T=5%, C=5%), а также сахарозу (30%), акриловую кислоту (10 мМ, рK 4,5) и винилимидазол (5 мМ, рK 6,5), в резервуар — такой же раствор акриламида, но содержащий сахарозу в концентрации 5%, 5мМ акриловую кислоту и 10 мМ винилимидазол. После заполнения формы смесью с линейным градиентом плотности и полимеризации мы получим гель, несущий химически иммобилизованный на матрице линейный градиент концентрации акриловой кислоты 10—5 мМ (от анода к катоду) и встречный линейный градиент концентрации винилимидазола 10—5 мМ (от катода к аноду). Эти встречные градиенты прямо задают линейный градиент pH 4,5—6,5 с минимумом электропроводности и буферной емкости посередине, в диапазоне значений pH, равноудаленных от обоих значений рK. Тем не менее в этой системе именно благодаря химической иммобилизации буферных компонентов оказывается возможным равновесное фокусирование разделяемых белков при очень высоком напряжении, характерном для обычного ИЭФ в системах амфолитов-носителей. Применение этого подхода может ознаменовать новую революцию в области изоэлектрического фракционирования. Во-первых, появится уникальная возможность проводить разделение в строго определенных условиях среды, при заданной ионной силе и концентрации буферных групп. Во-вторых, при соответствующем подборе исходных реагентов — слабой кислоты и слабого основания — мы сможем иммобилизовать любой градиент протяженностью в 1—2 ед. pH, руководствуясь непосредственно требованием оптимального разделения данной белковой смеси. И, в-третьих, поскольку буферные компоненты иммобилизованы на матрице геля (которой может служить как полиакриламид, так и сефадекс или агароза), становится возможной изоионная элюция сфокусированных белков, свободных от примеси высокомолекулярных или низкомолекулярных амфолитов.

Может показаться, что все это звучит слишком красиво, чтобы быть правдой, и тем не менее я готов держать пари, что метод вскоре заработает. А если нет, то пусть эту книгу постигнет самая жестокая участь в духе Брэдбери — «451 по Фаренгейту». (Bradbury, 1953)!

ГЛАВА 2

Препаративное изоэлектрофокусирование

За прошедшие годы стало ясно, что ИЭФ действительно является весьма эффективным методом препаративного фракционирования. Любой хороший препаративный метод должен обладать высокой разрешающей способностью и давать высокий выход при разделении значительных количеств материала без существенного изменения физико-химических или биологических свойств разделяемых объектов. ИЭФ удовлетворяет большинству этих критериев и имеет также дополнительные преимущества. Например, в отличие от многих других методов ИЭФ позволяет добиться уникального сочетания высокой загрузки образца и хорошего разрешения. В предыдущей главе уже отмечалось, что оба этих параметра удается оптимизировать при фокусировании в пологом градиенте pH, которое сопровождается образованием более широких зон, способных «вместить» большее количество препарата, чем соответствующие участки крутого градиента pH (разд. 1.5.9). Другое преимущество ИЭФ заключается в том, что при надлежащем выборе интервала pH многие ненужные компоненты окажутся вовсе удалены из зоны фракционирования. Наконец, поскольку ИЭФ — это равновесный метод, разделение сопровождается концентрированием разбавленных образцов.

С помощью различных экспериментальных приемов, использованных для выявления реальных возможностей ИЭФ, удалось подтвердить предсказанные теорией значения предельной загрузки и разрешающей способности метода при хороших выходах как по белку, так и по биологической активности. Среди удачных экспериментальных подходов к препаративному фракционированию можно отметить ИЭФ в вертикальных колонках со стабилизацией при помощи градиента плотности, в горизонтальных лотках со спонтанно образующимся градиентом плотности, в зонально-конвекционных системах, а также в сплошных полимерных гелях типа ПААГ или в гранулированных гелях типа сефадекса — в форме горизонтального слоя или в вертикальной колонке. Каждая система имеет свои преимущества. Некоторые из этих систем, например, выигрывают за счет

7—1488

изоэлектрической преципитации, которая сама по себе является бичом многих других систем.

В этой главе рассмотрено большинство используемых в настоящее время вариантов препаративного ИЭФ. Особое внимание уделено таким параметрам, как максимальная загрузка, разрешающая способность, возможность детектирования и выход разделяемых компонентов. Обсуждаемые препаративные системы, позволяющие фракционировать от миллиграммов до граммов белка, разбиты на три основные группы: ИЭФ в жидкой среде, ИЭФ в слое сефадекса, ИЭФ в полиакриламидном геле.

В качестве обзоров общего характера по препаративному ИЭФ можно порекомендовать следующие публикации: Rilbe, 1970; Winters, Karlsson, 1976; Fawcett, 1975 b, 1976 a; Bours, 1976; Righetti, 1975 a; Radola, 1976; Quast, 1979; Just, Werner, 1979.

2.1. Препаративное ИЭФ в жидкой среде

2.1.1. Колонки фирмы LKB

Один из самых первых вариантов препаративного ИЭФ был основан на применении колонок, в которых антиконвекционная стабилизация градиента pH достигается с помощью вертикального сахарозного градиента плотности. Конструкция колонки, предложенная в работе Svensson, 1962 b, была взята на вооружение фирмой LKB, которая выпускает два вида колонок — объемом 110 (LKB 8100-1) и 440 мл (LKB 8100-2). Устройство колонки показано на рис. 2.1. Допустимое содержание белка в зоне при ИЭФ составляет 5—25 мг для малой колонки и 20—80 мг для большой. Максимальная загрузка колонки препаратом зависит от числа компонентов, их растворимости в изоточке и формы градиента pH. Для большинства белков загрузка не должна превышать 5 мг на 1 см^2 площади поперечного сечения колонки.

Колонки этого типа требуют значительного расхода амфолитов-носителей. Концентрация амфолинов, как правило, должна быть не ниже 1%, что соответствует 1,1 и 4,4 г сухого вещества для малой и большой колонок соответственно. В случае амфолинов крайних диапазонов pH 2,5—4 и 9—11 рекомендуемая рабочая концентрация составляет 0,5%, поскольку они обладают вдвое большей электропроводностью, чем амфолины других диапазонов pH.

Градиент плотности. Для создания градиента плотности обычно используют растворы сахарозы, хотя допустимо применение и несахарозных градиентов. Идеальные составляющие градиен-

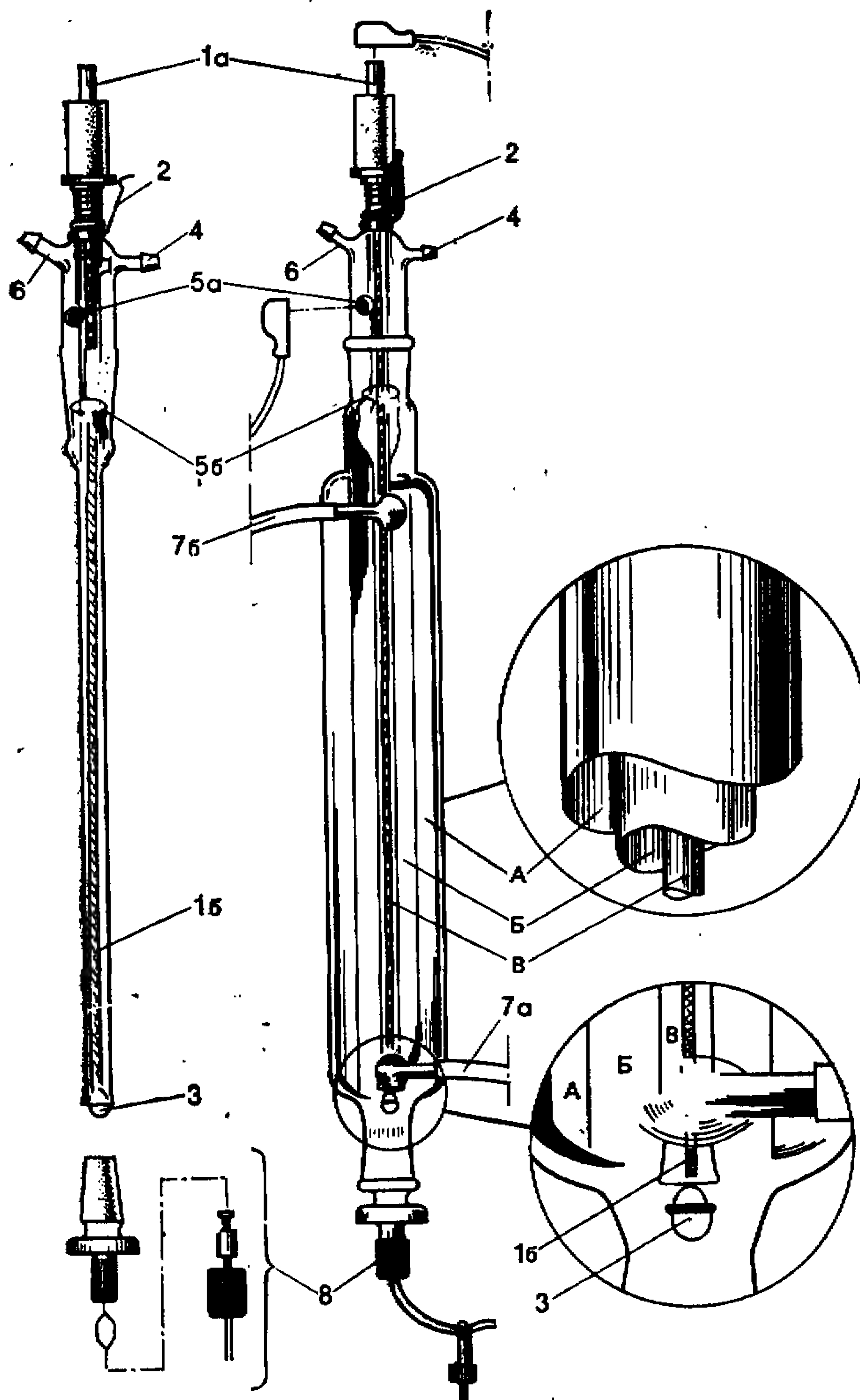


Рис. 2.1. Колонка объемом 110 мл, оснащенная платиновыми электродами, для изоэлектрического фракционирования белков. Изображен модифицированный вариант колонки, впервые описанной в работе Svensson, 1962b. ИЭФ белков протекает в отсеке Б. А — рубашка охлаждения; 7а и 7б — вход и выход охлаждающей жидкости. Один из электродов (5а, б), расположенный в верхней части колонки, контактирует с рабочим раствором в отсеке Б. Образующийся газ выходит через отверстие 6. Второй электрод (1а, б) расположен в центральной трубке В; электродный раствор, заполняющий эту трубку, в процессе ИЭФ контактирует с рабочим раствором в отсеке Б. Заглушка (3) центральной трубки соединяется при помощи жесткого тефлонового стержня с верхней головкой, в которой находится гнездо контакта (1а) с электродом (1б), укрепленным на стержне. Для того чтобы открыть центральную трубку, заглушку (3) опускают вниз, переводя головку в нижнее положение и закрепляя ее за крючок 2. Газ, образующийся на электроде 1, поднимается по центральной трубке и выходит через отверстие 4. Перед опорожнением колонки центральную трубку закрывают заглушкой 3, опуская крючок 2. Нижняя часть колонки закрыта пробкой 8 с отверстием, к которому присоединяется сливная трубка, ведущая к коллектору фракций (Vesterberg et al., 1967).

та должны очень хорошо растворяться в воде без образования ионов. Для формирования градиента плотности с величиной инкремента не менее чем 0,12 г/см^3 раствор должен иметь высокую плотность, но вместе с тем обладать достаточно низкой вязкостью. Наконец, составляющие градиента не должны реагировать с образцом и не должны мешать детектированию разделяемых компонентов.

Для приготовления сахарозного градиента плотности рекомендуется использовать препараты сахарозы высшей степени очистки (analytical grade). Требуемый градиент можно получить, исходя из двух растворов — «легкого», содержащего только амфолиты и образец, и «тяжелого», содержащего амфолиты, образец и сахарозу. Смешивая два этих раствора в определенных соотношениях, можно получить серию растворов с нарастающей плотностью. Эти растворы последовательно наслаивают на поверхность тяжелого электродного раствора, помещенного в нижнюю камеру колонки. Благодаря диффузии между слоями удается получить относительно плавный градиент плотности. Другой, более воспроизводимый способ формирования градиента плотности основан на применении смесителей градиента, таких, как Ampholine gradient mixer LKB 8121 и LKB 8122, рассчитанных на заполнение колонок объемом 110 и 440 мл соответственно. Применение смесителей этого типа (Svensson, Pettersson, 1968) позволяет получать линейные градиенты плотности исходя из равных объемов легкого и тяжелого растворов, различающихся по плотности на 0,2 г/см^3. Это различие в плотностях соответствует концентрации сахарозы 5 и 50% в легком и тяжелом растворах соответственно.

Для создания антиконвекционной среды могут быть использованы и другие вещества, например сорбитол (Vesterberg, 1971) или глицерин (Vesterberg, Berggren, 1966), особенно при ИЭФ в щелочном диапазоне, где может происходить ионизация сахарозы. Можно использовать и этиленгликоль (Ahlgren et al., 1967; Kostner et al., 1969), концентрация которого в тяжелом растворе ввиду более низкой плотности должна быть порядка 60—70%. В числе других возможных составляющих градиента стоит упомянуть маннитол и полигликаны, такие, как декстран (Leise, Le Sane, 1974) и фиколл (Sherbert et al., 1972; Sherbert, Lakshmi, 1973), поставляемые фирмой Pharmacia. Смешанные градиенты на основе сахарозы и фиколла используют для разделения клеток (Boltz, Todd, 1979), поскольку с помощью этих компонентов можно создать изоосмотические условия (303 мосм) в диапазоне плотностей от 1,035 до 1,055 г/см^3. Для этого в колонке одновременно с градиентом концентрации фиколла 1—10% создают обратный градиент концентрации сахарозы от 7 до 5%.

Было описано также получение градиента плотности с по-

мощью тяжелой воды (Fredriksson, Pettersson, 1974; Fredriksson, 1975). ИЭФ в градиенте D_2O проводилось только в небольшой спектрофотометрической ячейке объемом 1,5 мл (Jonsson et al., 1973). Градиенты этого типа формировались непосредственно в ячейке за счет взаимной диффузии трех растворов с различным содержанием D_2O в течение 3 мин (Rilbe, Pettersson, 1968). Хотя полный инкремент плотности в градиенте D_2O составляет лишь 0,1 г/см^3, вязкость в нем (при 5°С) примерно вдвое ниже, чем вязкость водного раствора сахарозы с такой же плотностью. Это приводит к более благоприятному распределению напряженности поля и уменьшению времени фокусирования. Следует отметить, что при измерении pH в градиенте D_2O получаются значения, завышенные по сравнению со значением pH в сахарозном градиенте. Это связано со смещением асимметричного потенциала стеклянного электрода в D_2O (по отношению к потенциалу в H_2O). Пока что не ясно, найдут ли градиенты D_2O практическое применение в области препаративного колоночного ИЭФ.

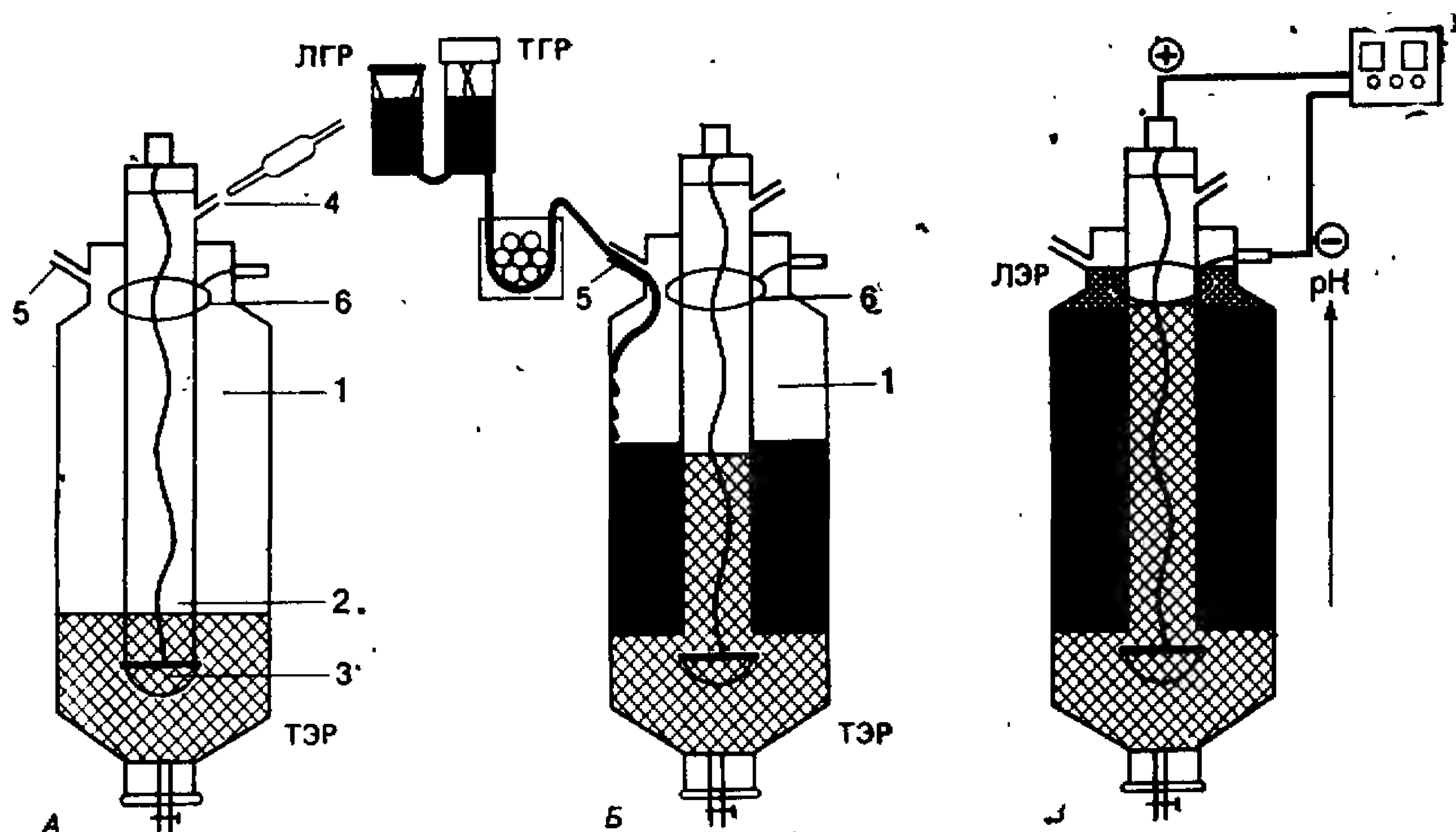


Рис. 2.2. Подготовка к работе колонки фирмы LKB для препаративного ИЭФ. *А*. Тяжелый электродный раствор (ТЭР) заливают в нижнюю часть колонки при открытом клапане (3) центрального электродного отсека (2). Этот раствор заливают через газоотводную трубку (4), с тем чтобы избежать загрязнения стенок разделительной камеры (1). *Б*. Градиент плотности наслаивают через входное отверстие отростка для внесения препарата (5) с помощью перистальтического насоса. Для формирования градиента плотности удобно использовать изображенный на рисунке смеситель. В стаканы смесителя заливают легкий градиентный раствор (ЛГР) и тяжелый градиентный раствор (ТГР). *В*. Легкий электродный раствор (ЛЭР) наслаивают поверх градиента до полного погружения электродной петли (6). После этого электроды присоединяют к блоку питания. (С любезного разрешения фирмы LKB Produkter AB.)

Таблица 2.1. Исходные растворы для приготовления градиента плотности в расчете на колонки (LKB) объемом 110 и 440 мл с использованием трех различных вариантов стабилизации (сахароза, глицерин, этиленгликоль)

Растворы для смесителя градиента	Колонка 110 мл (LKB 8100-1)	Колонка 440 мл (LKB 8100-2)
Стабилизация сахарозой		
Тяжелый градиентный раствор		
Сахароза	27 г	107,5 г
H_2O+амфолины (+образец)	37 мл	150 мл
Общий объем	54 мл	215 мл
Концентрация сахарозы	50%	50%
Легкий градиентный раствор		
Сахароза	2,7 г	10,75 г
H_2O+амфолины (+образец)	53 мл	207 мл
Общий объем	54 мл	215 мл
Концентрация сахарозы	5%	5%
Стабилизация глицерином		
Тяжелый градиентный раствор	30 мл	118 мл
Глицерин, 87%	24 мл	97 мл
H_2O+амфолины (+ образец)		
Общий объем	54 мл	215 мл
Концентрация глицерина	60%	60%
Легкий градиентный раствор		
H_2O+амфолины (+образец) = =общий объем	54 мл	215 мл
Концентрация глицерина	0%	0%
Стабилизация этиленгликолем		
Тяжелый градиентный раствор		
Этиленгликоль, 100%	40,5 мл	161 мл
H_2O + амфолины (+ образец)	13,5 мл	54 мл
Общий объем	54 мл	215 мл
Концентрация этиленгликоля	75 %	75%
Легкий градиентный раствор		
H_2O + амфолины (+образец) = =общий объем	54 мл	215 мл
Концентрация этиленгликоля	0 %	0%

Итак, при заполнении колонки градиент плотности, содержащий амфолиты и образец, наслаивают на плотную «подушку» раствора электролита, расположенную в нижней части колонки. Поверх градиента наслаивают легкий раствор второго электролита (рис. 2.2). В табл. 2.1 приведены прописи исходных растворов для получения градиентов плотности с использованием трех вариантов стабилизации (сахароза, глицерин и этиленгли-

Таблица 2.2. Электродные растворы для двух вариантов выбора полярности электродов в расчете на колонки (фирмы LKB) объемом 110 и 440 мл

Электродный раствор	Колонка 110 мл (LKB 8100-1)	Колонка 440 мл (LKB 8100-2)
Анод вверху колонки		
Катодный раствор (pH ~ 11,7)	15 г сахарозы + 10 мл H_2O + 6 мл 1 *М* NaOH	48 г сахарозы + 30 мл H_2O + 20 мл 1 *М* NaOH
Общий объем	25 мл	80 мл
Концентрация сахарозы	60%	60%
Анодный раствор	1,5 мл 1 *М* H_3PO_4 + 8,5 мл H_2O	6 мл 1 *М* H_3PO_4 + 34 мл H_2O
Общий объем	10,0 мл	40,0 мл
Катод вверху колонки		
Катодный раствор	2,5 мл 1 *М* NaOH + 7,5 мл H_2O	10 мл 1 *М* NaOH + 30 мл H_2O
Общий объем	10,0 мл	40 мл
Анодный раствор (pH ~ 1,2)	15 г сахарозы + 12 мл H_2O + 4 мл 1 *М* H_3PO_4	48 г сахарозы + 38 мл H_2O + 12 мл 1 *М* H_3PO_4
Общий объем	25 мл	80 мл
Концентрация сахарозы	60%	60%

коль) в расчете на колонки объемом 110 и 440 мл. В табл. 2.2 предложен состав электродных растворов для обоих типов колонок и для обоих вариантов выбора полярности верхнего электрода (который может служить и катодом, и анодом).

Электродные растворы. Выбор полярности электродов. Для защиты амфолитов-носителей от анодного окисления и катодного восстановления их отделяют от электродов растворами кислоты или щелочи соответственно. В ходе ИЭФ кислóты и основания удерживаются у соответствующих электродов и амфолиты обоих крайних областей pH «отталкиваются» от электродных камер, расположенных в противоположных концах колонки. Как правило, в качестве анолита используют разбавленный раствор сильной кислоты (например, 1%-ную фосфорную или серную кислоту), а в качестве католита — разбавленный раствор основания (2%-ный этаноламин, 2%-ный этилендиамин или 8%-ный NaOH). При ИЭФ в узком диапазоне pH (например, шириной в 1 ед. pH) в качестве электролитов рекомендуется использовать более слабые кислоты и основания. Желательно, чтобы значения pH в растворах электролитов не слишком силь-

но выходили за рамки рабочего интервала pH разделения для предотвращения чрезмерного скачка pH и электропроводности на границе между электродными камерами и рабочим пространством разделительной колонки. Так, анодный раствор может содержать аспарагиновую, глутаминовую, уксусную или лимонную кислоты, а катодный раствор — аргинин, лизин, трис или гистидин.

При выборе полярности электродов следует учитывать, что анод лучше располагать в нижней части колонки, чтобы свести к минимуму искажения, которые могут возникнуть в результате ионизации сахарозы в щелочной среде у катода (Flatmark, Vesterberg, 1966). Следует учитывать и диапазон значений pI разделяемых компонентов. Целесообразно выбирать полярность электродов таким образом, чтобы белки фокусировались в нижней половине, ближе к выходу из колонки. Это уменьшит размывание сфокусированных зон в процессе элюции, которую проводят в отсутствие электрического поля. Кроме того, при выборе полярности электродов надо учитывать распределение электропроводности в градиенте pH. Известно, что в полностью сформированном градиенте имеется минимум электропроводности между pH 6 и 7 (разд. 1.5.5). С другой стороны, на распределение электропроводности влияет вязкость раствора, которая изменяется вдоль всего градиента плотности. Возрастание плотности и вязкости раствора вызывает понижение электропроводности. Обычно стараются выбрать полярность электродов так, чтобы оба фактора (pH и вязкость) частично компенсировали друг друга, т. е. чтобы минимум электропроводности (в области pH 6—7) располагался в верхней части колонки. Следовательно, при ИЭФ в диапазоне pH ниже 6 в качестве верхнего электрода следует выбирать катод, а при ИЭФ в диапазоне pH выше 6 — анод. В частности, при использовании амфолинов pH 9—11 вверху обязательно должен располагаться анод. Аналогично при работе с амфолинами pH 2,5—4 верхний электрод должен быть катодом. Однако если при препаративном ИЭФ, особенно в случае сильно загрязненных препаратов, выпадает осадок, то полярность электродов лучше выбрать так, чтобы преципитация происходила в нижней части колонки. Следует иметь в виду, что при обычной элюции капилляр может забиться осадком, и в этом случае лучше проводить ступенчатую элюцию через верх колонки (разд. 4.1).

Внесение образца. Для ИЭФ, которое является равновесным методом, способ внесения образца не так важен, как для других электрофоретических методов, где необходимо наносить препарат в виде очень тонкого слоя. При ИЭФ образец вместе с амфолитами и сахарозой можно включить в состав тяжелого или легкого градиентных растворов или в оба раствора одновре-

менно. В ходе ИЭФ образец концентрируется, поэтому его начальный объем не имеет значения, он может составлять до 80% полного объема колонки. Можно вносить образец и в виде более узкой зоны ближе к предполагаемой области его фокусирования. Это уменьшает время проведения эксперимента и предотвращает неблагоприятное влияние кислой и щелочной среды на разделяемые белки, так как позволяет избежать их контакта с крайними областями градиента pH.

Как отмечалось в предыдущей главе, величина предельно допустимой загрузки препаратом зависит от многих факторов. Среди них — геометрия колонки, количественный и качественный состав препарата, растворимость разделяемых компонентов в изоточке, диапазон pH разделения, концентрация амфолитов-носителей и напряженность электрического поля. Увеличение площади поперечного сечения (так же как и сужение рабочего диапазона pH) позволяет повысить загрузку препаратом, поэтому при работе с большей из двух колонок фирмы LKB, имеющей такую же высоту, что и меньшая колонка, четырехкратное различие в объеме позволяет пропорционально увеличить содержание белка в образце. Количество соли и буферных компонентов, попадающих в систему вместе с препаратом, не должно превышать 0,5 мМ в расчете на колонку объемом 110 мл и 1,5 мМ — в расчете на колонку 440 мл. Высокая концентрация соли может привести к недопустимо высокой плотности тока в начале эксперимента, а также к дополнительному образованию кислоты у анода и щелочи у катода. Рекомендуется предварительно отдиализовать образец против 1%-ного глицина (Vesterberg et al., 1967; Wadström, 1967) или 1%-ного раствора амфолинов соответствующего диапазона pH. Глицин, как известно, является «плохим амфолитом-носителем». В диапазоне pH 4—8 он практически не заряжен, но существенно увеличивает диэлектрическую проницаемость среды и, таким образом, стабилизирует растворенные белки. Перед использованием диализный мешочек следует обработать горячей 10%-ной уксусной кислотой, тщательно промыть дистиллированной водой, а затем вымочить в соответствующем растворе, приготовленном для диализа. Поскольку белки, как правило, более устойчивы в слабощелочной среде, для диализа часто используют амфолины диапазонов pH 6—8, 7—9 и 8—10.

Электрические параметры. Общая электрическая мощность, приложенная к системе, не должна превышать возможности колонки по рассеянию выделяющегося тепла. Фокусировочные колонки фирмы LKB оснащены весьма эффективной системой теплоотдачи. Рабочее пространство колонки располагается между поверхностями двух концентрических полых цилиндров, что позволяет использовать водяное охлаждение и с внешней, и с

внутренней сторон. При охлаждении циркулирующей жидкостью с температурой 2—4 °С можно проводить ИЭФ при мощности 3—4 Вт для малой колонки (110 мл) и 8—10 Вт — для большой (440 мл).

Применение новых источников питания со стабилизацией по мощности позволило повысить предельную мощность до 15 Вт (V_{max}=1600 В) для малой колонки и до 30 Вт (V_{max}=2000 В) — для большой (Winter, Karlsson, 1976). В работе Haglund, 1971, отмечается, что фокусировочную колонку не следует охлаждать ниже 2—4 °С. Температурный коэффициент для вязкости и электропроводности в смеси сахароза—амфолины имеет практически неизменную величину вплоть до 1 °С, но резко возрастает при более низких температурах. Соответственно незначительные колебания температуры в колонке, термостатируемой ниже чем при 2 °С, могут вызвать искажение зон и ухудшить разрешение.

Сила тока при ИЭФ максимальна в самом начале эксперимента, когда все амфолиты хаотически распределены по колонке. Для предотвращения чрезмерного разогрева следует строго контролировать начальное напряжение в системе. В обычных условиях, при концентрации амфолинов около 1%, начальное напряжение может составлять 400—500 В. В дальнейшем, после падения электропроводности в результате миграции амфолитов в зоны своих изоточек, для повышения разрешающей способности напряжение можно поднять до 1600—2000 В. Источники питания со стабилизацией по мощности проводят эту операцию автоматически. После того как сила тока установилась на неизменно низком уровне, можно считать, что система достигла состояния равновесия. Время, за которое устанавливается равновесие, зависит от конкретных электрофоретических условий, от температуры охлаждающей жидкости и при работе с традиционными источниками питания обычно составляет от 24 до 72 часов для обоих типов колонок. Это время удается сократить, используя системы стабилизации мощности тока.

ИЭФ в узком диапазоне pH или при концентрации амфолитов выше 1% протекает значительно дольше. Определить оптимальное время фокусирования в каждом конкретном случае можно только эмпирически. Следует подчеркнуть, что на завершающем этапе миграция амфолитов и белков к своим равновесным положениям происходит настолько медленно, что падение силы тока может на этом этапе оказаться практически незаметным. Соответственно лучше перестраховаться и продолжить разделение еще в течение нескольких часов после того, как сила тока уже вышла на плато.

По окончании ИЭФ содержимое колонки сливают через отверстие в ее нижней части (рис. 2.3) или вытесняют через верх более плотным раствором, подаваемым снизу. Собирают фрак-

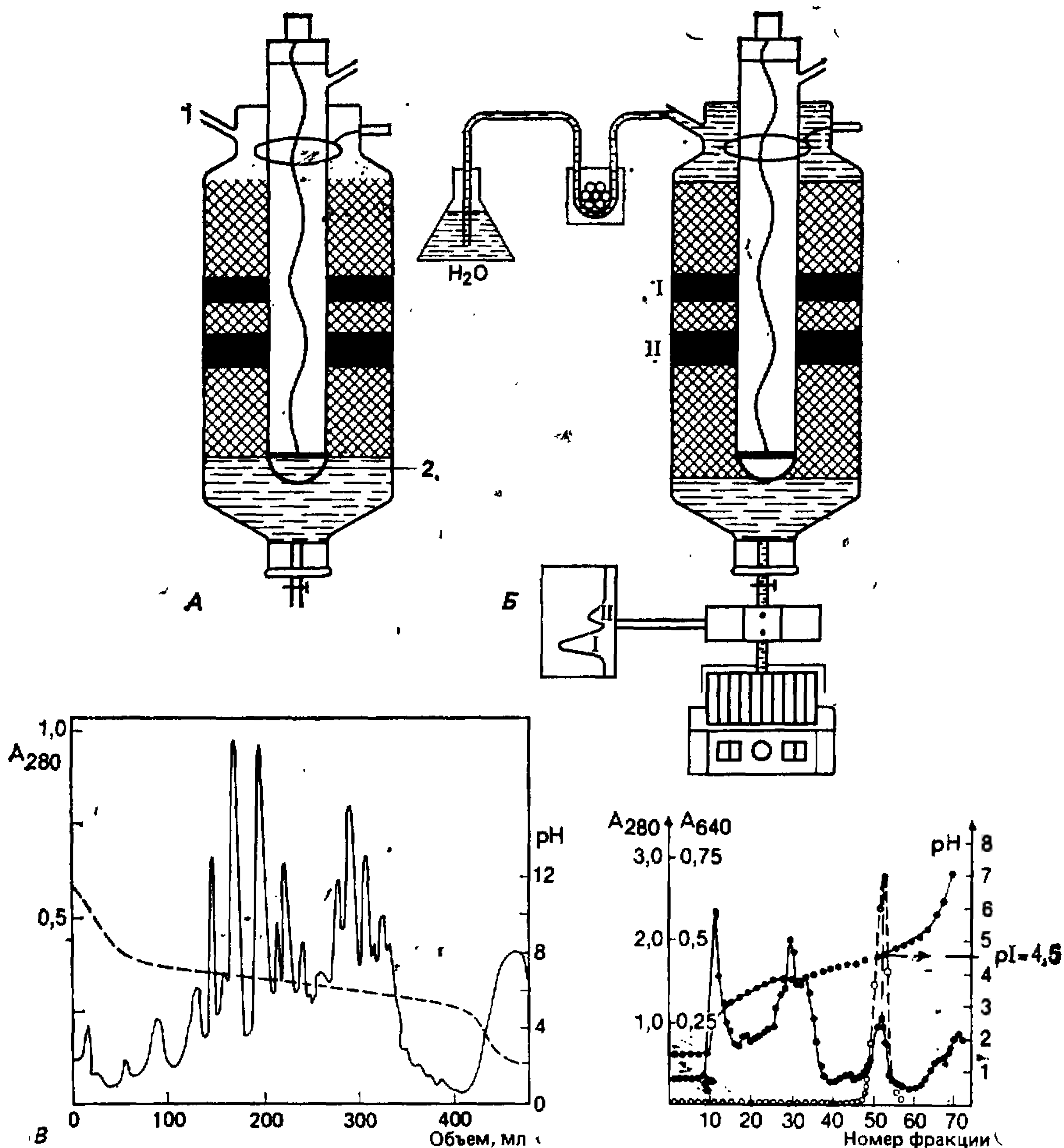


Рис. 2.3. Опорожнение колонки (фирмы LKB) после ИЭФ. *А*. По окончании разделения закрывают заглушку (2) центрального электродного отсека и откачивают легкий электродный раствор через выходное отверстие отростка (1). *Б*. К отростку присоединяют трубочку, идущую через перистальтический насос к сосуду с дистиллированной водой. Верхнюю часть колонки заполняют водой, а затем герметизируют место стыка трубочки с входным отверстием отростка. Элюат желательно пропускать через проточную кювету УФ-детектора с самописцем. Данный способ элюции (вытеснение водой сверху) более совершенен, чем другие варианты опорожнения колонки — «самотеком» (т. е. без насоса) или через насос, подсоединенный к выходу из колонки. *В*. Примеры типичных профилей УФ-поглощения и градиентов pH, регистрируемых при элюции с вытеснением. Правый график иллюстрирует, каким образом определяют значение pI для данного белкового пика. (С любезного разрешения фирмы LKB Produkter AB.)

ции по 1—4 мл и определяют в них pH и содержание белка. Это можно делать вручную или автоматически, пропуская элюат через проточную кювету прибора, измеряющего и записывающего pH и УФ-поглощение. Желательно измерять pH во фракциях при той же температуре, при которой проводилось ИЭФ (разд. 4.5). Найдено, что оптимальная скорость элюции составляет 60 мл/ч для колонки объемом 110 мл и 240 мл/ч для колонки объемом 440 мл.

Использование колонок этого типа оказалось весьма эффективным для решения целого ряда задач. Тем не менее они не лишены некоторых конструктивных недостатков, накладывающих ограничение на величину предельной загрузки образца, а также приводящих к ухудшению реального разрешения компонентов из-за размывания зон при элюции. Многие белки весьма склонны к преципитации при pH вблизи их pI. Осаждение другого рода может происходить тогда, когда плотность в сфокусированной зоне, содержащей большое количество белка, окажется выше плотности раствора на данном участке градиента. Диффузия сфокусированных компонентов, происходящая в ходе достаточно продолжительного процесса элюции в отсутствие электрического поля, и частичное перемешивание зон в нижней камере при переходе жидкости из колонки в сливную трубку также отрицательно сказываются на результатах фракционирования. Дополнительное размывание зон может происходить и за счет краевых эффектов при течении жидкости по капилляру, соединяющему колонку с коллектором фракций. Поэтому длина такого капилляра должна быть минимальной. Следует также использовать проточные кюветы минимального объема. Прохождение элюата через перистальтический насос является еще одним фактором, способствующим размыванию зон. Его можно устранить, проводя элюцию без насоса или подключая насос к верхней части колонки (через трубку 5 на рис. 2.2) и подавая через него воду таким образом, чтобы она постепенно вытесняла вниз содержимое колонки. Скорость элюции в этом случае будет определяться скоростью подачи воды перистальтическим насосом.

В работе Boddin et al., 1975, предложен метод, который позволяет проводить элюцию из фокусировочной колонки под напряжением. Авторы использовали конструкцию обычного аппарата для электрофореза и полиакриламидном геле. Нижнее отверстие колонки (трубки) закрывали пробкой с отверстием, а нижний электрод отделяли от сахарозного градиента ионопроницаемой мембраной, обеспечивающей непрерывный электрический контакт.

2.1.2. Колонки фирмы ISCO

Фирма ISCO (Instrumentation Speciality Company — специализированное объединение по производству оборудования) производит два типа фокусировочных колонок: модель 210 — для аналитического и полупрепаративного ИЭФ и модель 630 — для препаративного ИЭФ. Первая имеет внутренний диаметр 1 см и длину 30 см; ее устройство показано на рис. 2.4. Максимальный объем градиента — 23 мл, максимальная загрузка по белку — около 10 мг. При температуре охлаждающей жидкости 2°C можно проводить ИЭФ при электрической мощности до 15 Вт. Препаративная модель имеет аналогичное устройство. С ее помощью можно проводить ИЭФ в градиенте объемом до 160 мл при длине пути до 32 см. Термостатирование препаративной колонки при 2°C позволяет прикладывать электрическую мощность около 20 Вт. Интересной особенностью обеих моделей является коаксиальное расположение электродных камер относительно разделительной колонки. Каждый электрод отделен от рабочего объема концентрической мембраной, которая препятствует проникновению в колонку продуктов электролиза, способных исказить градиент pH. Эти мембраны предотвращают также выход компонентов градиента за пределы разделительной колонки.

Преимуществом колонок этого типа является наличие сканирующего устройства, которое позволяет непосредственно контролировать процесс ИЭФ. Для этого отключают ток и постепенно вытесняют столб градиента вверх так, чтобы весь его объем проходил мимо окошка денситометра, который регистрирует профиль поглощения при одной или нескольких длинах волн. Таким образом, проводя повторные сканирования через определенные промежутки времени, можно следить за ходом разделения и точно определить момент установления равновесия в системе. Кроме того, имеется специальное приспособление для внесения препарата в середину колонки на любой стадии процесса. Таким образом можно провести сканирование градиента до внесения образца для записи базовой линии поглощения предварительно сфокусированных амфолинов (Righetti, Drysdale, 1971). При сканировании градиент продвигают вверх по колонке мимо измерительного фотоэлемента, накачивая тяжелый раствор сахарозы в нижнюю часть колонки. Сканирование и опорожнение колонки осуществляется при помощи непульсирующего насоса шприцевого типа. В этой конструкции в отличие от колонок фирмы LKB практически не происходит перемешивания жидкости на выходе из колонки, поэтому удается получать достаточно узкие зоны разделяемых компонентов. Таким образом, появляется возможность отчасти избежать искажений, связан-

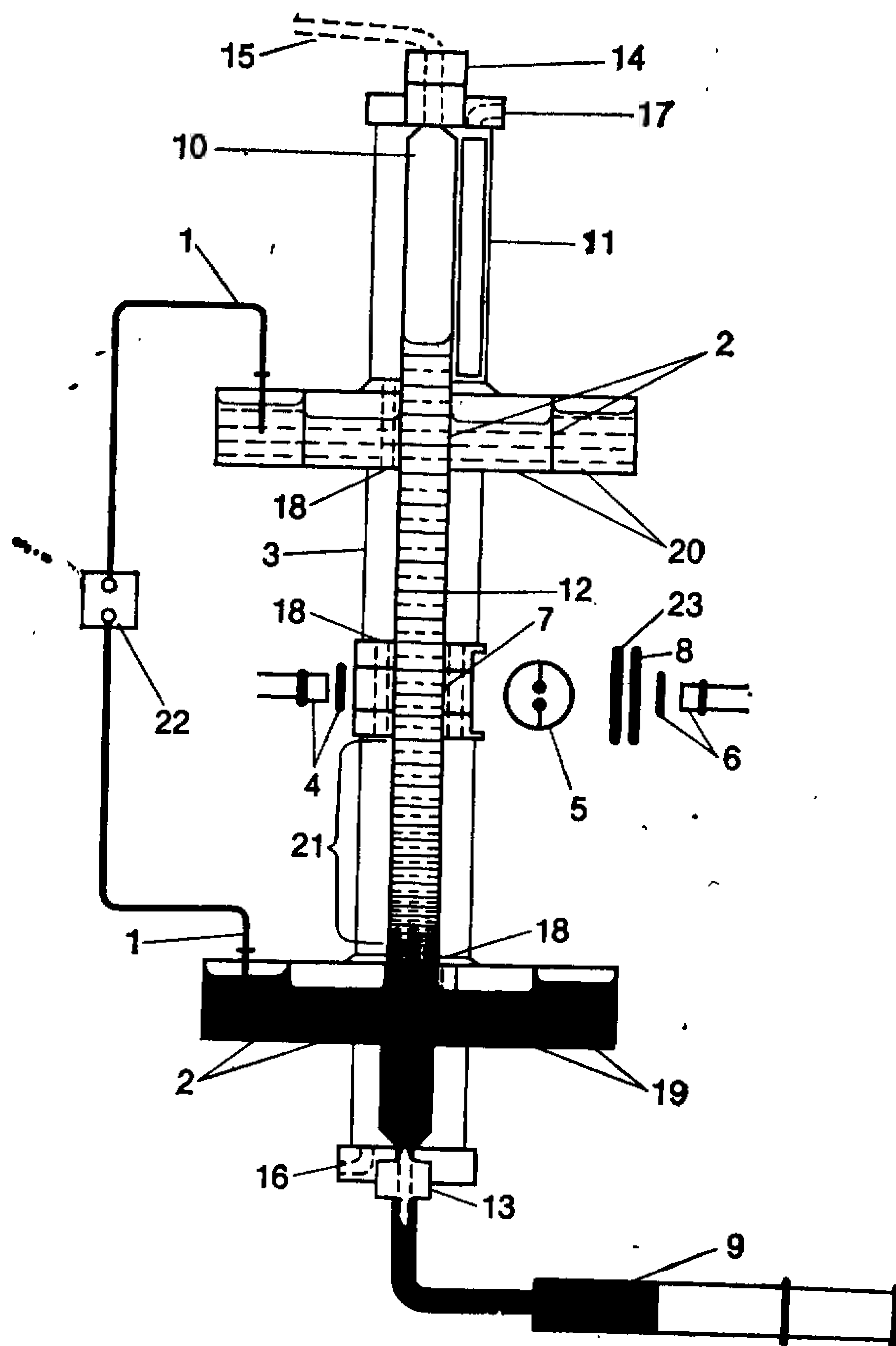


Рис. 2.4. Схематическое изображение колонки фирмы ISCO (модель 210) для электрофоретического фракционирования в градиенте плотности. 1 — платиновый проволочный электрод, 2 — полупроницаемые мембраны, 3 — рубашка охлаждения, 4 — фильтр и измерительный фотоэлемент, 5 — вакуумная ртутная лампа, 6 — фильтр и фотоэлемент сравнения, 7 — кварцевые окошки, 8 — подвижная заслонка, 9 — насос шприцевого типа, 10 — прозрачная центральная трубка, 11 — сантиметровая шкала, 12 — центральная тефлоновая трубка (внутренний диаметр 1 см), 13 — основание колонки, 14 — съемная головка для заполнения колонки градиентом плотности и для внесения образца, 15 — вывод на коллектор фракций, 16 — ввод охлаждающей жидкости, 17 — вывод охлаждающей жидкости, 18 — соединительный канал проточной системы охлаждения, 19 — нижний электродный отсек, 20 — верхний электродный отсек, 21 — разделительиая колонка, 22 — источник питания со стабилизацией по мощности, 23 — система УФ-стандартов. (Leaback, Wrigley, 1976.)

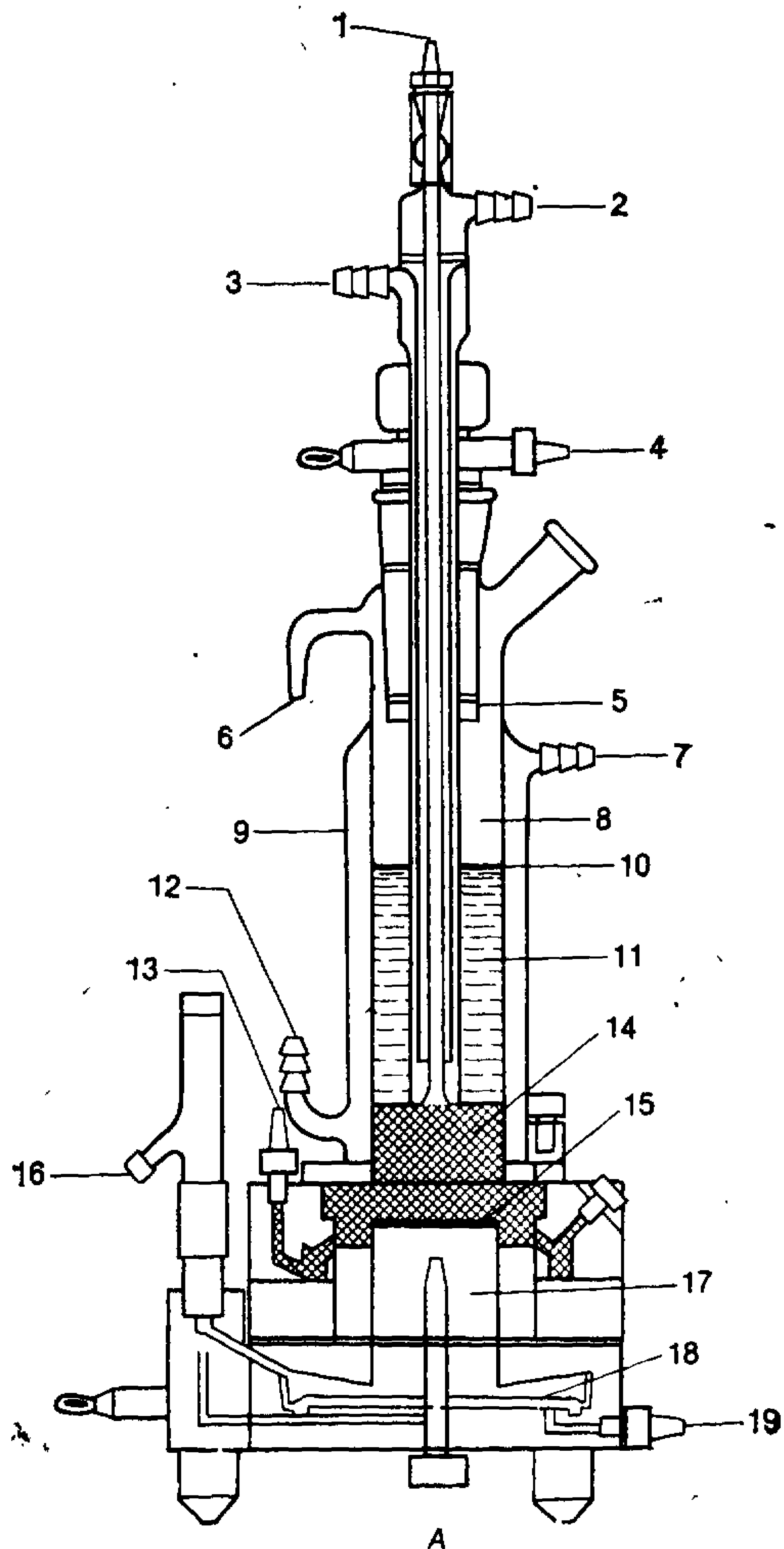
ных с конвекцией и с различными эффектами турбулентного и ламинарного течения элюата, которые характерны для других систем. Принципиальное устройство колонок этого типа было описано в работе Brakke et al., 1968. Используемый метод сканирования отличается от метода, предложенного в работе Catsimpoolas, 1973 c, который позволяет непосредственно регистрировать профиль поглощения в колонке, не отключая тока, т. е. не прерывая процесса ИЭФ. Использование такого подхода, получившего название «предстационарное ИЭФ» (transient state IEF), дает ценную информацию о кинетике изоэлектрического фракционирования (Catsimpoolas, 1973 c—f)· Применение колонок фирмы ISCO для препаративного ИЭФ было впервые описано в работе Grant, Leaback, 1970. С подробным обзором методических аспектов использования таких колонок можно ознакомиться в публикации Leaback, Wrigley, 1976.

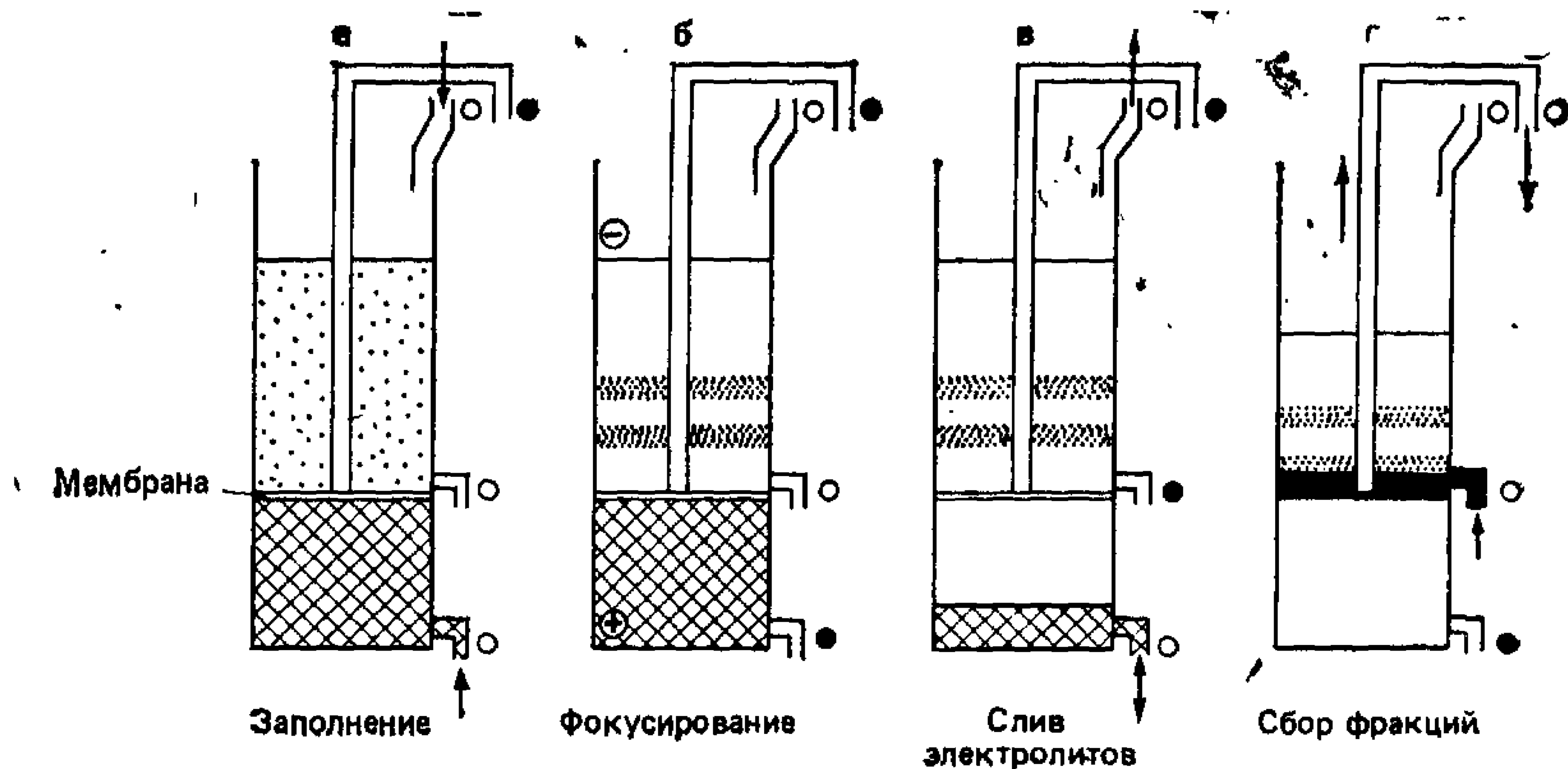
В работе Fawcett, 1975 c, было отмечено, что аналогичные эксперименты можно проводить на значительно более простой аппаратуре. Например, автор сконструировал модификацию U-образной ячейки с кварцевой колонкой в одном (разделительном) колене и трехходовым краном в нижней части ячейки. Кран предназначен для регуляции процессов заполнения и опорожнения колонки. В разделительном колене смонтирована также рубашка водяного охлаждения. Для опорожнения колонки удаляют верхний электрод и вытесняют градиент через верх, закачивая в нижнюю часть кварцевой трубки плотный раствор сахарозы. Головку детектора Uvicord II закрепляют в верхней части колонки, что позволяет регистрировать профиль УФ-поглощения в ходе элюции. Фракции поступают в коллектор через адаптер из силиконовой резины, присоединенный к верхнему выходу колонки. В той же работе (Fawcett, 1975 b) предложена конструкция аппарата, состоящего из двух или трех U-образных трубок. Аппараты такого типа можно применять для ИЭФ, сопровождающегося преципитацией образца или в случае загрязнения сфокусированных зон за счет очень высокого содержания примесей. В соответствующих местах ячеек расположены специальные краны, через которые можно легко извлекать сфокусированные компоненты. Охлаждение обычно осуществляется просто погружением аппарата в резервуар с охлажденной жидкостью.

2.1.3. Система Poly-Prep 200

В работе Catsimpoolas et al., 1980, описано применение системы Poly-Prep 200 производства американской фирмы Buchler Instruments (Fort Lee, New Jersey) для изоэлектрического фракционирования. Конструкция аппарата показана на рис. 2.5, *А*.

Рис. 2.5. Устройство системы Poly-Prep 200 (фирма Buchler Instruments). *А*. Схематическое изображение аппарата в рабочем состоянии. 1 — к коллектору фракций, 2 — охлаждение (вход), 3 — охлаждение (выход), 4 — верхний буфер (вход), 5 — электрод, 6 — верхний буфер (выход), 7 — охлаждение (выход), 8 — верхний буфер, 9 — разделительная колонка, 10 — образец, 11 — сахарозный градиент плотности, 12 — охлаждение (вход), 13 — вытесняющий тяжелый раствор (вход), 14 — тяжелый раствор (подложка), 15 — пористый стеклянный фильтр, 16 — нижний буфер (выход), 17 — нижний буфер, 18 — электрод, 19 — нижний буфер (вход). *Б*. Этапы процесса ИЭФ в градиенте плотности. Стрелками указано направление потока жидкости, кружками — рабочее положение кранов — открытое (○) или закрытое (●).





Он состоит из четырех узлов — разделительной колонки, внутренней стеклянной трубки системы охлаждения и двух нижних электродных отсеков, выполненных из оргстекла. В собранном виде стеклянная разделительная камера имеет систему охлаждения как с внутренней, так и с наружной стороны. Рабочее пространство колонки в форме кольца, заключенного между поверхностями двух концентрических цилиндров, имеет площадь поперечного сечения 17,6 см^2. Разделительная камера отделена от нижнего электродного отсека жесткой мембраной из пористого стекла. Рабочие растворы поступают через входное отверстие в нижней части колонки. Выход растворов из колонки осуществляется через тонкую трубку, смонтированную по центру, вдоль вертикальной оси, в рубашке внутреннего охлаждения. По окончании разделения с помощью вытесняющего плотного раствора градиент (начиная снизу) выкачивают из колонки через эту трубку и подают на коллектор фракций.

Исходно аппарат был сконструирован для препаративного электрофореза в геле (Jovin et al., 1964). Процесс ИЭФ в нем включает четыре этапа, которые схематически показаны на рис. 2.5, *Б:* а — формирование градиента плотности, внесение образца и заполнение электродных отсеков; б — фокусирование; в — слив нижнего электролита (анолита) и промывание нижней камеры; г — сбор фракций с использованием вытесняющего раствора. Сообщалось о применении этой системы для выделения нуклеозидфосфорилазы из эритроцитов.

2.1.4. Колонки Свенссона (Рильбе)

Помимо колонок, выпускаемых фирмой LKB (Svensson, 1962 b), Свенссон (Рильбе) и его коллеги разработали вертикальные колонки другой конструкции, а также усовершенствовали конструкцию горизонтального многокамерного электролизера. В 1973 г. в Глазго Рильбе сделал сообщение о разработке системы препаративного ИЭФ в градиенте плотности в короткой колонке с вертикальным охлаждением. Предложение использовать широкие короткие колонки с вертикальным теплоотводом было высказано еще в работе Philpot, 1940. В публикации Rilbe, Pettersson, 1975, сообщалось о создании двух колонок этого типа, различающихся устройством системы охлаждения. Обе колонки были небычайно широкие и короткие. В одной из них расстояние между электродами составляло лишь 1,55 см при площади поперечного сечения 283,5 см^2 и общем объеме 440 мл. Электроды были изготовлены из сплава палладия (75%) и серебра (25%) в виде пластин, припаянных к латунным контактам по краям колонки. Теплоотвод осуществлялся главным образом через поверхность электродов, что приводило к возник-

новению в колонке вертикального температурного градиента. Равновесие достигалось очень быстро, в течение 30 мин, падение напряжения на завершающем этапе составляло 75 В/см. Ввиду такой своеобразной геометрии колонки для заполнения и опорожнения ее приходилось переворачивать на бок. Недостатки этой конструкции заключаются в возможности загрязнения в результате анодного окисления металла и в быстром размывании сфокусированных зон в процессе поворота колонки на 90°С перед элюцией.

Другая колонка была устроена аналогично и имела объем 110 мл. Она оснащалась электродами значительно меньшего размера, изготовленными из платиновой проволоки. Вертикальное охлаждение осуществлялось через поверхности целлофановых мембран, отделяющих рабочий объем от электродных отсеков. Растворы электролитов в этих отсеках охлаждались и перемешивались. Фокусирование занимало обычно 90 мин, разность потенциалов к концу процесса достигала 125 В. Заполняли и опорожняли колонку также в перевернутом положении. В такой колонке за 3 ч удавалось провести изоэлектрическое фракционирование более чем 1 г миоглобина кашалота в градиенте pH 7—9 (Rilbe, Pettersson, 1975). Основные полосы (Mb1, pI 7,6, в виде комплекса с Fe^{2+} и pI 8,3, в виде комплекса с Fe^{3+}) содержали около 800 мг белка — весьма внушительное количество для ИЭФ в градиенте плотности. Таким обра-

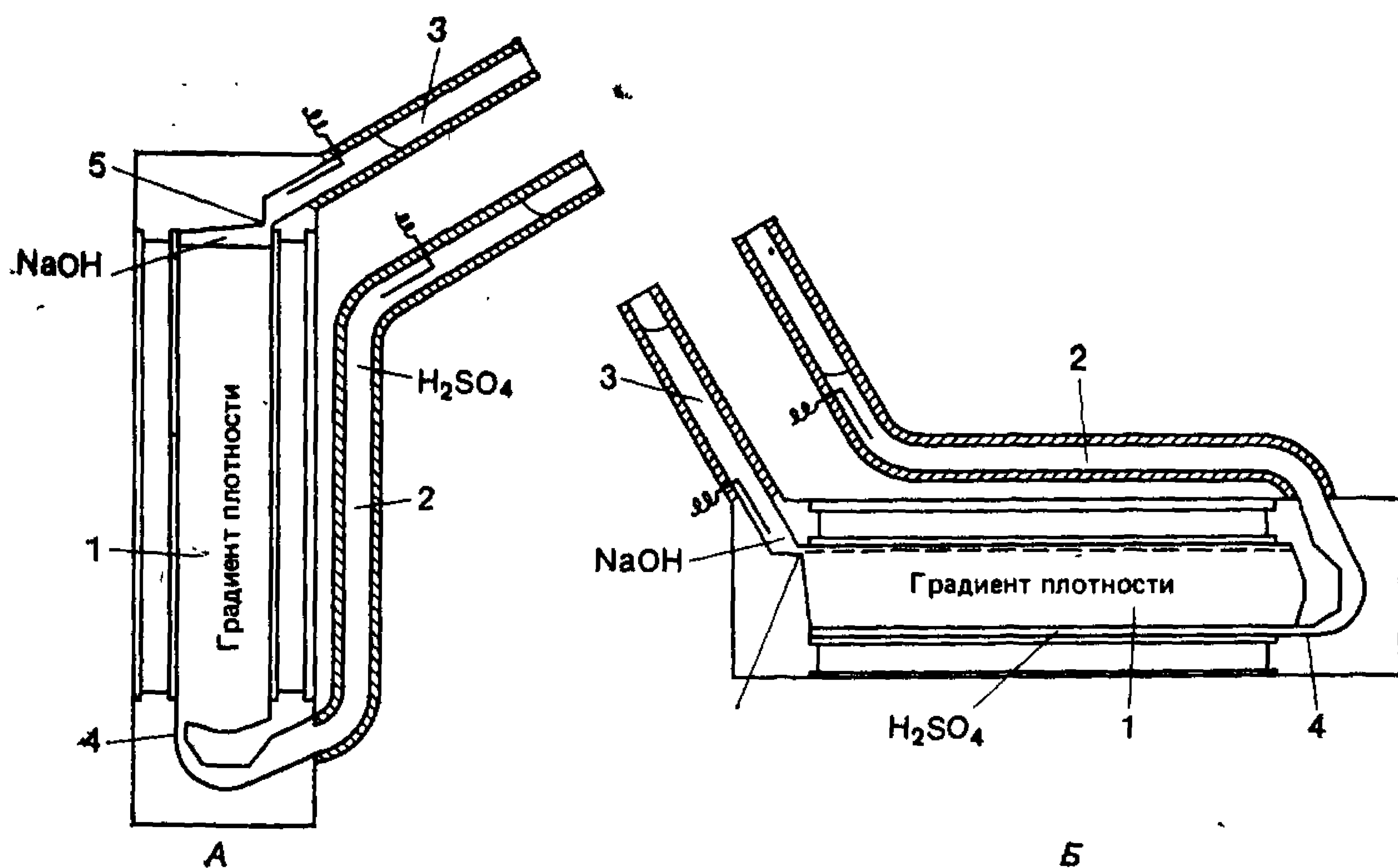


Рис. 2.6. Схематическое изображение прямоугольной ячейки для ИЭФ в градиенте плотности. Показаны два альтернативных рабочих положения ячейки — вертикальное (*А*) и горизонтальное (*Б*). 1 — разделительная камера, 2 и 3 — наклонные трубки с электродами, 4 и 5 — зазоры для заполнения и опорожнения разделительной камеры. (Jonsson et al., 1980.)

зом, главные преимущества колонок данного типа — это очень высокая допустимая загрузка образцом и сравнительно высокая скорость фокусирования.

Группа Рильбе в Гётенбурге продолжила работу в том же направлении. Недавно появилась публикация Jonsson et al., 1980, в которой представлен новый вариант колонки для ИЭФ в градиенте плотности, использующий принцип последовательного фракционирования в горизонтальном и в вертикальном положениях. Устройство и функционирование этой системы схематически показано на рис. 2.6. Объем колонки 112 мл. На первом этапе проводят быстрое предварительное фокусирование с низким разрешением при горизонтальном расположении ячейки (длина пути 20 мм). На втором этапе осуществляют высокоэффективное тонкое разделение компонентов путем ИЭФ в вертикальном положении (длина пути 112 мм). Ячейка имеет форму параллелепипеда и оснащена электродными резервуарами особой конструкции, что позволяет легко переводить ее из горизонтального положения в вертикальное простым поворотом на 90°. Весь процесс ИЭФ, включая тонкое разделение в вертикальном положении, продолжается всего лишь 4 ч при допустимой загрузке образца по меньшей мере около 1 г.

2.1.5. Зонально-конвекционное ИЭФ по Вальмету

В работе Valmet, 1969, был описан принципиально новый метод препаративного изоэлектрического фракционирования, который получил название «зонально-конвекционное ИЭФ». Уникальная особенность этого метода состоит в том, что он не нуждается в использовании какой-либо антиконвекционной среды. Разделение происходит в цепочке последовательно соединенных U-образных трубок. Разделительная камера (рис. 2.7) выполнена из пластика и имеет толщину стенок 1 мм. По конструкции она напоминает цепочку тизелиусовых ячеек с сечением 3×40 мм. Высота каждой U-образной ячейки 10 мм. Расстояние между желобками также около 10 мм. Камера состоит из двух разделительных блоков — лотка и крышки. Лоток сделан в виде неглубокого ящика прямоугольной формы с гофрированным дном. Нижняя поверхность крышки имеет аналогичный складчатый профиль. При сборке камеры «зубцы» крышки попадают в соответствующие «карманы» лотка и частично вытесняют находящуюся в них жидкость таким образом, что электрическая цепь в камере замыкается. Электроды расположены в противоположных концах камеры. Стабилизация сфокусированных зон достигается за счет эффекта Людвига — Соре (Ludwig, 1856; Soret, 1879). Фокусирование белка в каком-либо из карманов лотка сопровождается его концентрированием у дна при

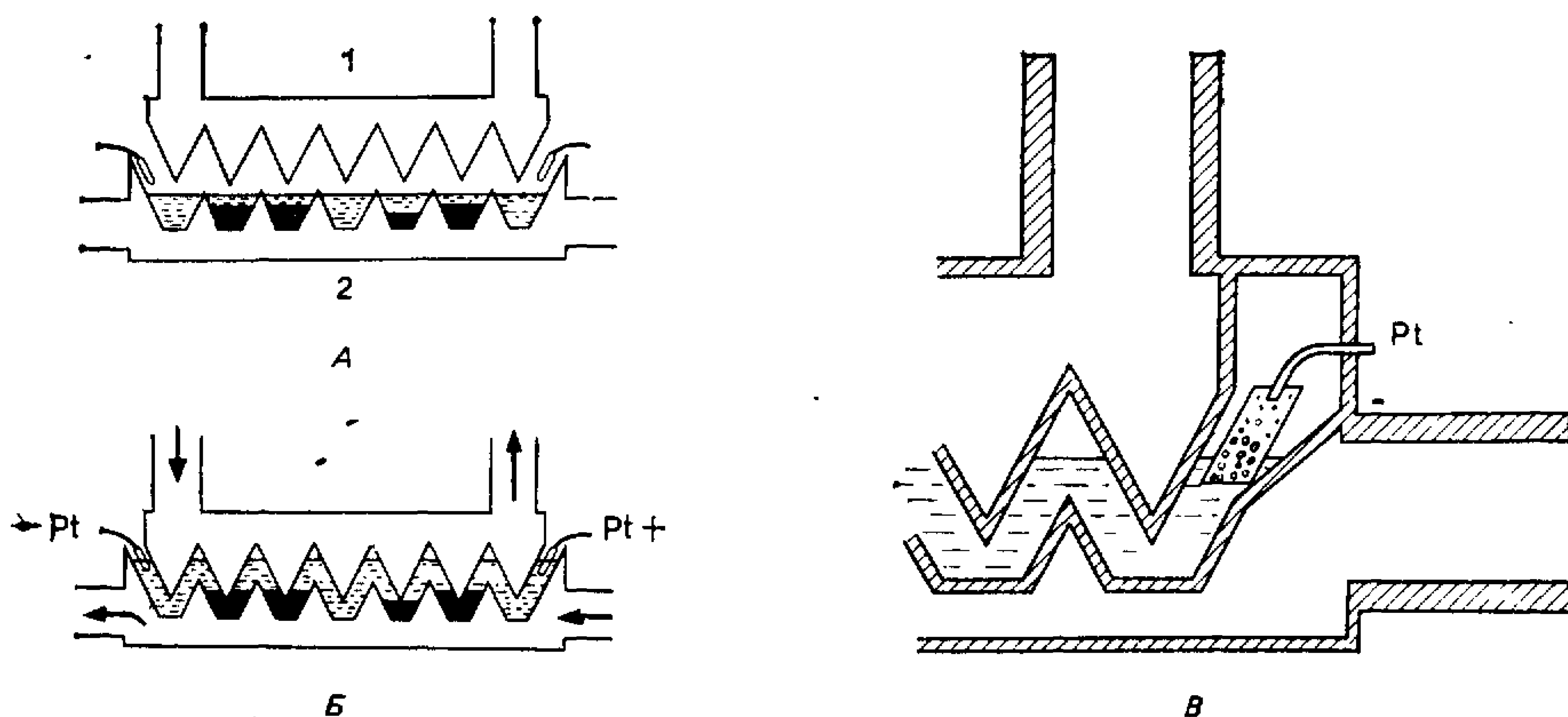


Рис. 2.7. Схематическое изображение аппарата Вальмета для зонально-конвекционного ИЭФ. *А*. Крышка (1) и лоток (2) в нерабочем положении (до или после ИЭФ). *Б*. Крышка и лоток переведены в рабочее положение (во время ИЭФ). *В*. Один из электродных отсеков. (Valmet, 1969; с любезного разрешения LKB Produkter AB.)

контакте с охлаждаемой поверхностью кармана. Таким образом возникает локальный вертикальный градиент плотности, перпендикулярный направлению электрического тока в камере.

По окончании процесса крышку снимают, и жидкость снова стекает в карманы лотка, который, таким образом, играет и роль коллектора фракций. Сконцентрированные белковые фракции можно собрать со дна с помощью перистальтического насоса, а остаток раствора, содержащего амфолиты-носители, использовать для следующего разделения. При работе с камерой Вальмета изоэлектрическая преципитация белков является скорее преимуществом, чем недостатком. Она облегчает детектирование зон и дает возможность отделить белок от раствора амфолитов просто с помощью центрифугирования. С другой стороны, неизоэлектрическая преципитация может привести к значительному загрязнению компонентов.

С помощью своего прибора Вальмету удалось также разделить смесь амфолитов на фракции с узкими рабочими диапазонами рН. При ИЭФ амфолинов рН 3—10 в камере с тридцатью ячейками он получил фракции, перекрывающие диапазоны в 0,2—0,3 ед. рН. Загрузка образцом в системе Вальмета может быть значительно выше, чем в обычных системах ИЭФ в вертикальном градиенте плотности. Автор сообщал о фракционировании 350 мг сывороточного белка в 50 мл 1%-ного раствора амфолинов. Таким образом, высокая загрузка по белку, экономный расход амфолинов и другие преимущества обеспечивают эффективность использования этого прибора для крупно-

масштабного ИЭФ. К сожалению, промышленный выпуск прибора такого типа не налажен, что объясняется главным образом технологическими трудностями, связанными с его изготовлением.

Метод Вальмета был успешно использован в работе Bodwell, Creed, 1973, для фракционирования целого ряда различных белков. Аналогичный подход к препаративному ИЭФ в работе Fawcett, 1975 b, был сделан на основе модификации устройства, предложенного ранее Kalous, Vacik, 1959. Несмотря на успешное фракционирование овальбумина в широком диапазоне pH, попытки разделения компонентов миоглобина в щелочной области pH оказались не очень удачными. Это скорее всего было связано с малоэффективным охлаждением и электроосмотическими эффектами. На том же принципе (Valmet, 1969, 1970) был основан и прибор, описанный в работе Rose, Harboe, 1970. Он представлял собой систему U-образных трубок, последовательно соединенных через верх в одну волнистую линию. Кирюхин увеличил число отсеков в аппарате Вальмета с 30 до 48 (Kiryukhin, 1972). Этот модифицированный прибор был использован для выделения чистого альбумина из кроличьей сыворотки (Troitski et al., 1974 a; Tolkacho, 1974).

2.1.6. *Зонально-конвекционное ИЭФ по Тальботу*

По счастью, концепция зонально-конвекционного ИЭФ не была забыта и получила дальнейшее развитие в работе Talbot, 1975, где описана новая, более практичная конструкция прибора, основанная на принципе Вальмета. Эта конструкция позволяет не только избежать трудностей, связанных с неизоэлектрической преципитацией образцов, но также предусматривает легкий доступ к градиенту pH и возможность автоматического фракционирования градиента по окончании ИЭФ.

Разделительная камера имеет форму лотка, изготовленного из алюминиевого блока высотой 2,5, шириной 6,25 и длиной 50 см. Рифленое дно и стенки лотка образуют 52 желобка («кармана»). Лоток имеет изолирующее лаковое покрытие; в его основание вмонтированы охлаждающие змеевики, обеспечивающие эффективный теплоотвод благодаря непосредственному контакту с металлом. Имеется также специальная крышка, препятствующая испарению жидкости. На противоположных концах лотка расположены электродные пластины. Лоток укрепляется на подставке, может поворачиваться вокруг длинной оси и фиксироваться в двух положениях — горизонтальном или под углом 45° к плоскости подставки. Для проведения ИЭФ в лоток заливают 30 мл 1%-ного раствора амфолинов, который равномерно распределяют по всем желобкам, покачивая лоток. Затем закрепляют его под углом 45°, что обеспечивает электрический

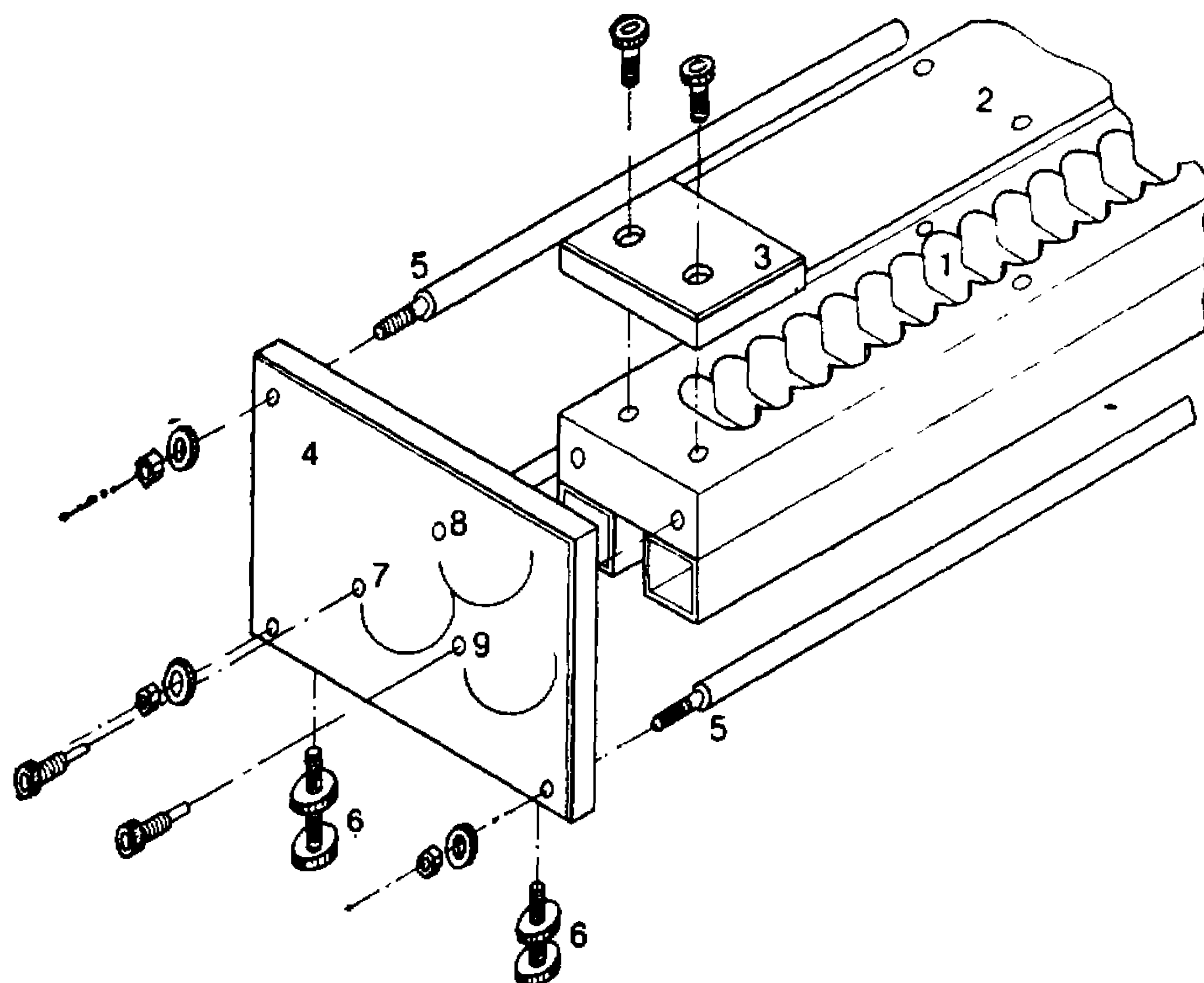


Рис. 2.8. Устройство аппарата Тальбота для зонально-конвекционного ИЭФ (фрагмент). 1 — разделнтельная камера (лоток), 2 — крышка, 3 — электродная пластина, 4 — торцевая пластина, 5 — крепежные стержни из нержавеющей стали, 6 — установочные винты, 7 — поворотная ось, 8 и 9 — фиксаторы. (Talbot, Caie, 1975.)

контакт по всей длине разделительной камеры. В качестве анолита используют 1%-ную фосфорную кислоту, в качестве католита — 1%-ный ТЕМЭД. Фракционирование обычно проводят при 4°С, формируя градиент pH до внесения образца. При начальных электрических параметрах 450 В и 1 мА стабильный градиент pH устанавливается приблизительно за 24 ч. После внесения образца фокусирование проводят еще в течение 72 ч. Устройство камеры показано на рис. 2.8. Для получения отдельных фракций по окончании ИЭФ лоток просто переводят в горизонтальное положение. При этом размыкаются контакты между отдельными желобками, со дна которых собирают фракции, содержащие сфокусированные компоненты. Значения pH в каждой фракции можно определить непосредственно в приборе с помощью комбинированного микроэлектрода. При ИЭФ этим способом меченых белков вируса ящура в работе Talbot, Caie, 1975, выход компонентов составлял от 80 до 100%.

2.1.7. Зонально-конвекционное ИЭФ по Денкла

Интересный вариант аппарата Вальмета был разработан и запатентован Денкла (Denckla, 1975, 1976). Конструкция разделительной камеры показана на рис. 2.9. Она разделена на ряд

отсеков невысокими перегородками (помечены цифрой 9), приклеенными к дну камеры. Более высокие перегородки (10), приклеенные к боковым стенкам камеры и примерно на 1 мм не достающие до дна, разделяют каждый отсек на два колена. Таким образом, система представляет собой цепочку последовательно соединенных U-образных ячеек. Все перегородки — полые, в их внутреннем пространстве циркулирует охлаждающая жидкость. Помимо высокоэффективной системы охлаждения важным преимуществом данной конструкции является также действенная система защиты от электроэндосмоса (перемещению водяного слоя Гельмгольца препятствуют очень узкие зазоры между перегородками *10* и дном камеры). По сравнению с аппаратом Вальмета для этого прибора допустимое падение напряжения на единицу длины оказывается выше в 10 раз, разрешающая способность — в 3 раза, эффективность теплоотвода на единицу объема — в 6 раз, скорость разделения — в 8 раз и максимальная загрузка препаратом — в 500 раз. Фракционирование можно проводить при напряжении до 60 000 В и мощ-

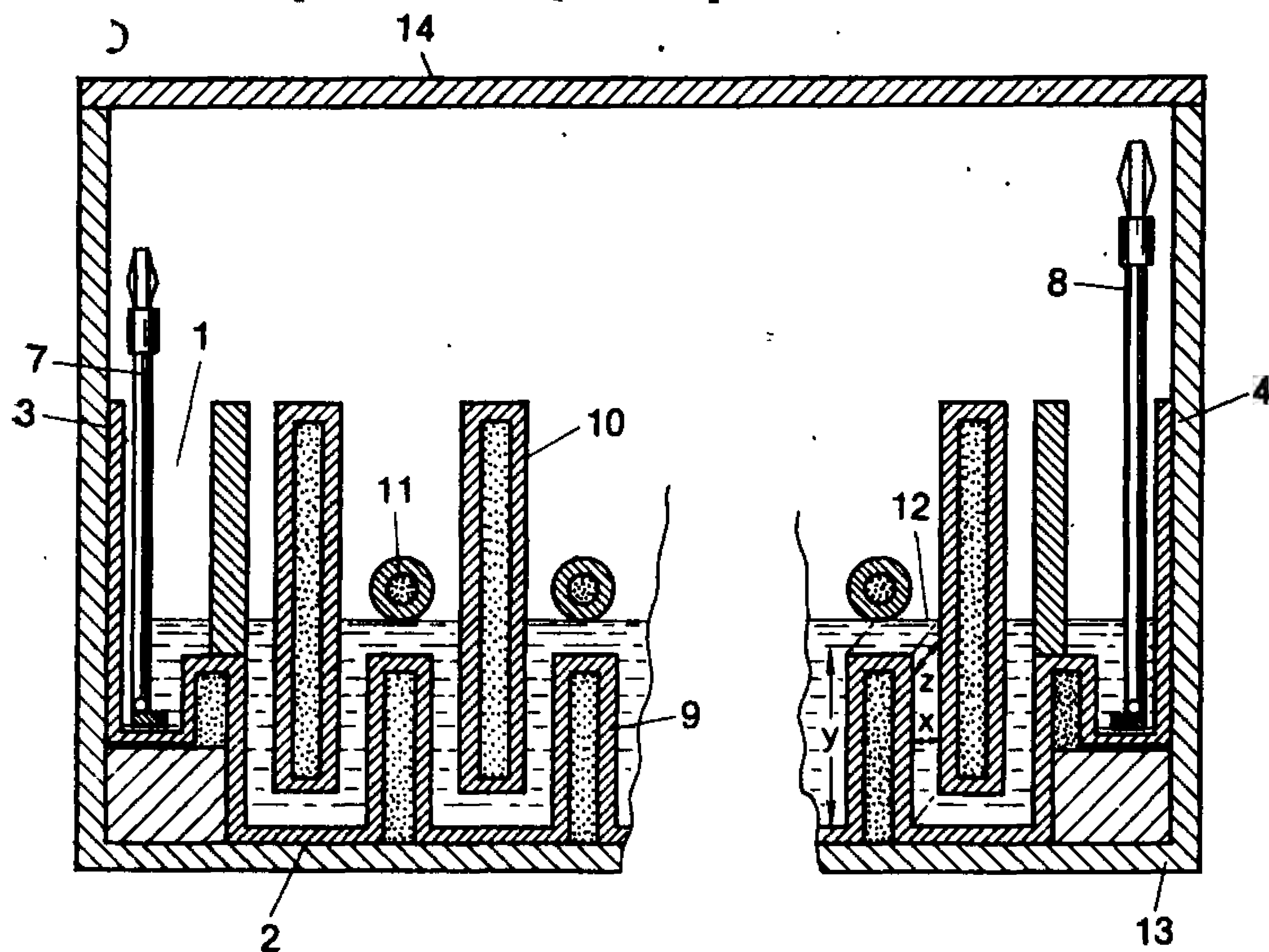


Рис. 2.9. Схематическое изображение аппарата Денкла для зонально-конвекционного ИЭФ. 1 — прямоугольная камера, заполненная рабочим раствором, 2 — дно камеры, 3, 4 — две противоположные торцевые стенки, 7, 8 — платиновые электроды, 9 — нижние перегородки, укрепленные на дне камеры, 10 — верхние перегородки, укрепленные на боковых стенках и не доходящие до дна камеры (все перегородки типа 9 и 10 — полые, что обеспечивает циркуляцию охлаждающей жидкости в их внутрением пространстве), 11 — дополнительные каналы системы охлаждения, 12 — обычный уровень рабочего раствора амфолитов, 13, 14 — корпус и крышка из изолирующего материала. *x*, *y*, *z* — ширина, высота и глубина колена U-образной ячейки. (Denckla, 1975, 1976.)

ности 6000 Вт (3 Вт/мл раствора). В методе Денкла применяется также принцип «каскадного разделения», суть которого заключается в последовательном использовании трех аналогичных по конструкции, но различающихся по размеру камер для фракционирования белков в поэтапно сужающемся градиенте pH. Все три камеры содержат по 10 ячеек, а общий объем каждой последующей камеры примерно в 10 раз меньше объема предыдущей. Таким образом, после фракционирования в камере большего размера содержимое одной из ее ячеек можно полностью перенести в следующую камеру. При этом все ячейки малой камеры оказываются заполненными, и фракционирование может быть продолжено в более пологом градиенте pH практически без разбавления и дополнительного расхода амфолитов-носителей. Разрешение, получаемое с помощью этого метода, — около 0,01 ед. pH. Для достижения такой разрешающей способности число U-образных ячеек в аппарате Вальмета пришлось бы увеличить до 700. Автор использовал свой прибор для очистки гормонов из экстрактов гипофиза (Denckla, 1974, 1977).

2.1.8. Зонально-конвекционное ИЭФ в сплошной спирали

Приспособление другого типа, также основанное на принципе Вальмета, было предложено в работе Macko, Stegeman, 1970. ИЭФ проводится в свернутой в спираль полиэтиленовой трубке длиной 10 см, с внутренним диаметром 4 мм и толщиной стенок 1 мм. С помощью двухсторонней липкой ленты спираль зафиксирована на медной трубке диаметром 20 мм. Фракционирование в такой спирали происходит по принципу зонально-конвекционного ИЭФ, при этом каждый виток спирали представляет собой как бы одну ячейку аппарата Вальмета. Спираль заполняют 10 мл раствора, содержащего сахарозу в концентрации 10% и амфолины в концентрации 1%. Полная загрузка препаратом — около 10—15 мг. Концы спирали, расположенные вертикально, заполняют анолитом и католитом. При ИЭФ спираль погружают в ледяную баню с перемешиванием или в термостат на 2°C таким образом, что концы спирали остаются выше уровня охлаждающей жидкости. По окончании разделения спираль быстро замораживают, предпочтительно жидким азотом, а затем разрезают на сегменты, содержимое которых переносят в маленькие пробирки.

Конструкция спиральной фокусировочной ячейки, описанная в работе Chilla et al., 1973, показана на рис. 2.10,*А*. На рис. 2.10,*Б* изображена специально разработанная система присоединения платиновых электродов (Bours, 1973c). Фокусирование в полиэтиленовой трубке (длина 100 см, внутренний диаметр 4 мм, наружный диаметр 6 мм) проводилось в течение 27 ч при

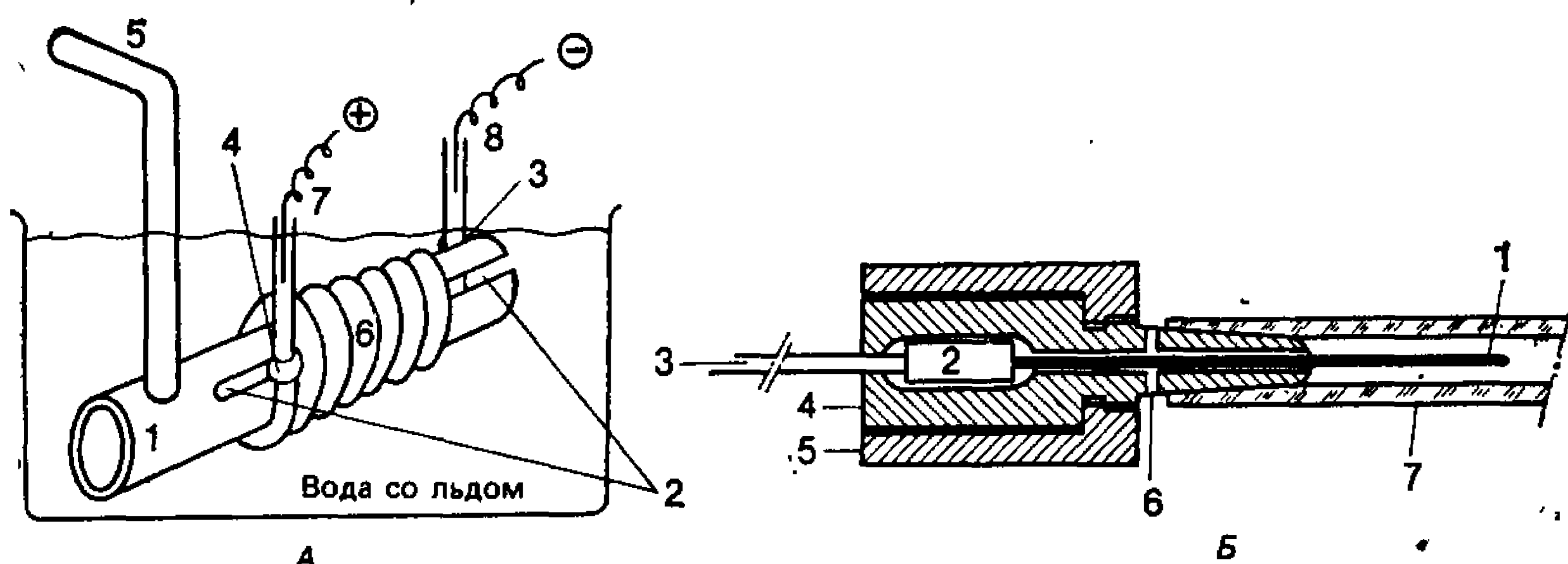


Рис. 2.10. *А*. Устройство системы для ИЭФ белков в свободной жидкости (в сплошной спирали). 1 — латунная трубка размером 25×170 мм, 2 — щель размером 4×120 мм, 3 и 4 — фиксаторы (стационарный и подвижный) для закрепления спирали, 5 — подвеска, 6 — спираль из полиэтиленовой трубки (внутренний диаметр 4 мм, наружный 6 мм, длина 1 м), 7 и 8 — платиновые электроды. (Chilla et al., 1973.) *Б*. Присоединение платинового электрода в системе ИЭФ в свободной жидкости. 1 — платиновая проволока, 2 — спайка с кабелем, 3 — кабель, ведущий к блоку питания, 4 — пластиковая головка, 5 — пластиковый защитный колпачок (18×25 мм), 6 — зазор для выхода газа, 7 — полиэтиленовая трубочка. (Bours, 1973c.)

напряжении 3800 В и силе тока от 850 мкА (в начале) до 160 мкА (в конце ИЭФ). В литературе имеются сообщения об использовании этого метода для фракционирования кристаллинов хрусталика (Bours, 1973 a, b), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Chilla et al., 1973), рибозофосфатизомеразы (Domagk et al., 1973, 1974) и фосфорилфосфатазы (Zech, Zurcher, 1973, 1974).

2.1.9. Зонально-конвекционное ИЭФ в «открытой» спирали

На рис. 2.11 показана конструкция прибора, предложенная в работе Quast, 1977. Принцип действия этой системы такой же, как у спиральных ячеек, описанных Macko, Stegeman, 1970, и Bours, 1973 c, а наиболее существенные особенности — это возможность многократного использования спирали, непосредственный доступ к каждой отдельной фракции и более высокая допустимая загрузка (на уровне граммов образца). В процессе ИЭФ спираль погружена в термостатируемую фреоновую баню. Рабочий раствор, содержащий образец и амфолиты-носители, заполняет витки спирали вплоть до основания вертикальных отводных трубок. Фракционирование протекает по тому же принципу, что и в работе Valmet, 1969. Сразу же по окончании процесса жидкость из верхней части каждого витка отсасывают с помощью системы шприцев с пластиковыми трубочками на конце, смонтированных на специальной раме. Таким образом, оставшаяся жидкость в соседних витках оказывается разделенной пузырьками воздуха. Сама спираль теперь, по сути дела, представляет собой цепочку из отдельных U-образных трубок, как

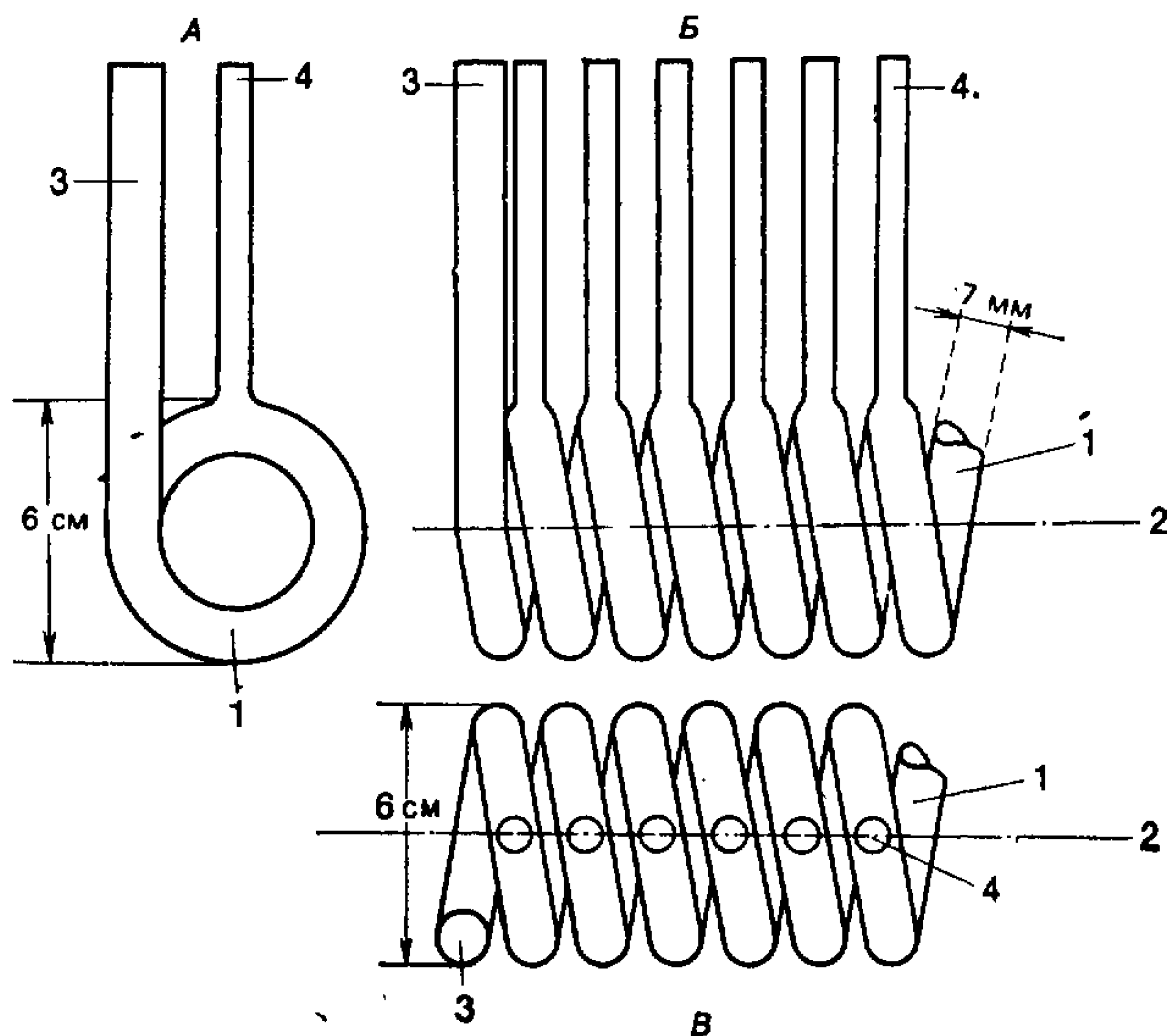


Рис. 2.11. Система для ИЭФ в открытой спирали. Стеклянная спиральная разделительная трубка; вид с торца (*А*), сбоку (*Б*) и сверху (*В*). 1 — витки спирали (диаметр витка 6 см, внутренний диаметр трубки 7 мм), 2 — ось спирали, 3 — электродный отсек на выходе спирали, 4 — вертикальные отводные трубки на каждом витке спирали. (Quast, 1977.)

в уже упоминавшемся змеевидном аппарате Rose, Harboe, 1970. Спираль, описанная в работе Quast, 1977, состоит из 37 витков, что соответствует получению 37 отдельных фракций объемом по 4,5 мл. Прибор достаточно компактен — спиральная стеклянная трубка имеет внутренний диаметр 7 мм, наружный — 9 мм при диаметре витка около 6 см. В то же время полное расстояние между электродами, т. е. длина раскрученной спирали, достигает 3,6 м. Это означает, что для ИЭФ в такой спирали необходимо очень высокое напряжение (автор работал при 25 000 В, т. е. около 70 В/см). При работе с обычными источниками питания процесс фокусирования окажется очень продолжительным; например, при 7,5 В/см ИЭФ будет длиться около 13 сут.

Существенно, что конструктивные особенности «открытой» спирали позволяют вносить образец уже после того, как градиент pH в основном сформировался, близко к области pI разделяемых компонентов. Следует отметить, что с помощью своего прибора автор исследовал также процесс ИЭФ в условиях постоянного обновления электродных растворов, составленных так, чтобы в градиенте pH возникал постоянный стационарный поток ионов нейтральной соли, препятствующих агрегации белков в изоточке. По сути, на том же самом принципе основан метод «стационарного реоэлектролиза» (разд. 2.1.17).

2.1.10. *Жидкостное ИЭФ во вращающихся трубках по Хьертену*

Этот метод основан на принципе электрофореза в свободной жидкости в варианте, предложенном в работе Hjertén, 1967. Как известно, одна из важнейших проблем методов электрофоретического разделения в свободной жидкости заключается в необходимости стабилизации зон разделяемых компонентов без помощи какой-либо поддерживающей среды. Для решения этой проблемы Хьертен предложил использовать принцип стабилизации вращением, проиллюстрированный на рис. 2.12. В работах Lundahl, Hjertén, 1973, и Hjertén, 1976, описано использование этого принципа в приборе для ИЭФ. Разделительной камерой в этом приборе служит горизонтальная кварцевая трубка с внутренним диаметром 3 мм, охлаждаемая водой и вращающаяся вокруг своей оси со скоростью 40 об/мин. Вращение препятствует конвекционному перемешиванию жидкости в трубке (см. подпись к рис. 2.12). Внутренняя поверхность трубки покрыта слоем метилцеллюлозы, устраняющим электроосмотические эффекты. Регистрация зон осуществляется прямым сканированием в УФ-свете, при этом записывается отношение поглощения при 280 и 320 нм, что позволяет свести к минимуму искажения, связанные с небольшими флуктуациями поглощения материала трубки, с загрязнениями на ее поверхности или в охлаждающей жидкости и т. д. «Прокладки» из гранулированного полиакриламида, расположенные по обоим концам трубки, предохраняют находящийся в ней раствор амфолинов от перемешивания с ано-

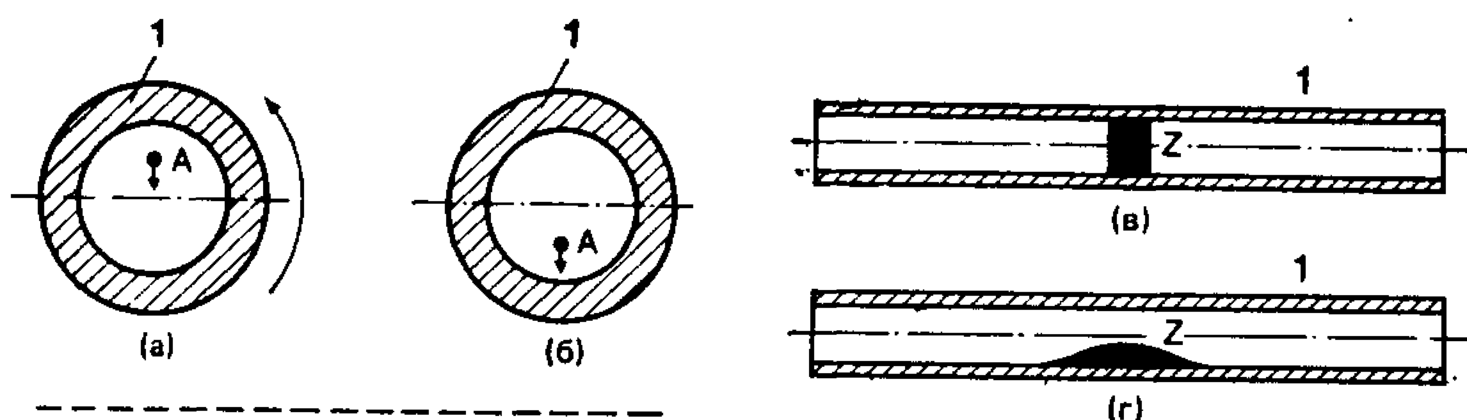


Рис. 2.12. Электрофорез в свободной жидкости. Проиллюстрирован принцип стабилизации зон благодаря вращению горизонтально расположенной электрофоретической трубки (1) вокруг длинной оси. А — элементарный объем жидкости, плотность которого выше, чем плотность рабочего буферного раствора. Если на этот объем в системе действуют только силы тяжести и трения, то его движение всегда будет направлено вниз. Это значит, что объем А будет удаляться от стенки, находясь в верхней половине сечения трубки (а), и приближаться к стенке, попадая в нижнюю половину сечения (б). Таким образом, из-за вращения трубки объем А будет попеременно то приближаться, то удаляться от стенки, что и соответствует стабилизации зоны. Если вращение прекратится, то четкая электрофоретическая зона Z, изображенная на продольном сечении (в), быстро начнет «оседать» и размываться (г). (Hjertén, 1967.)

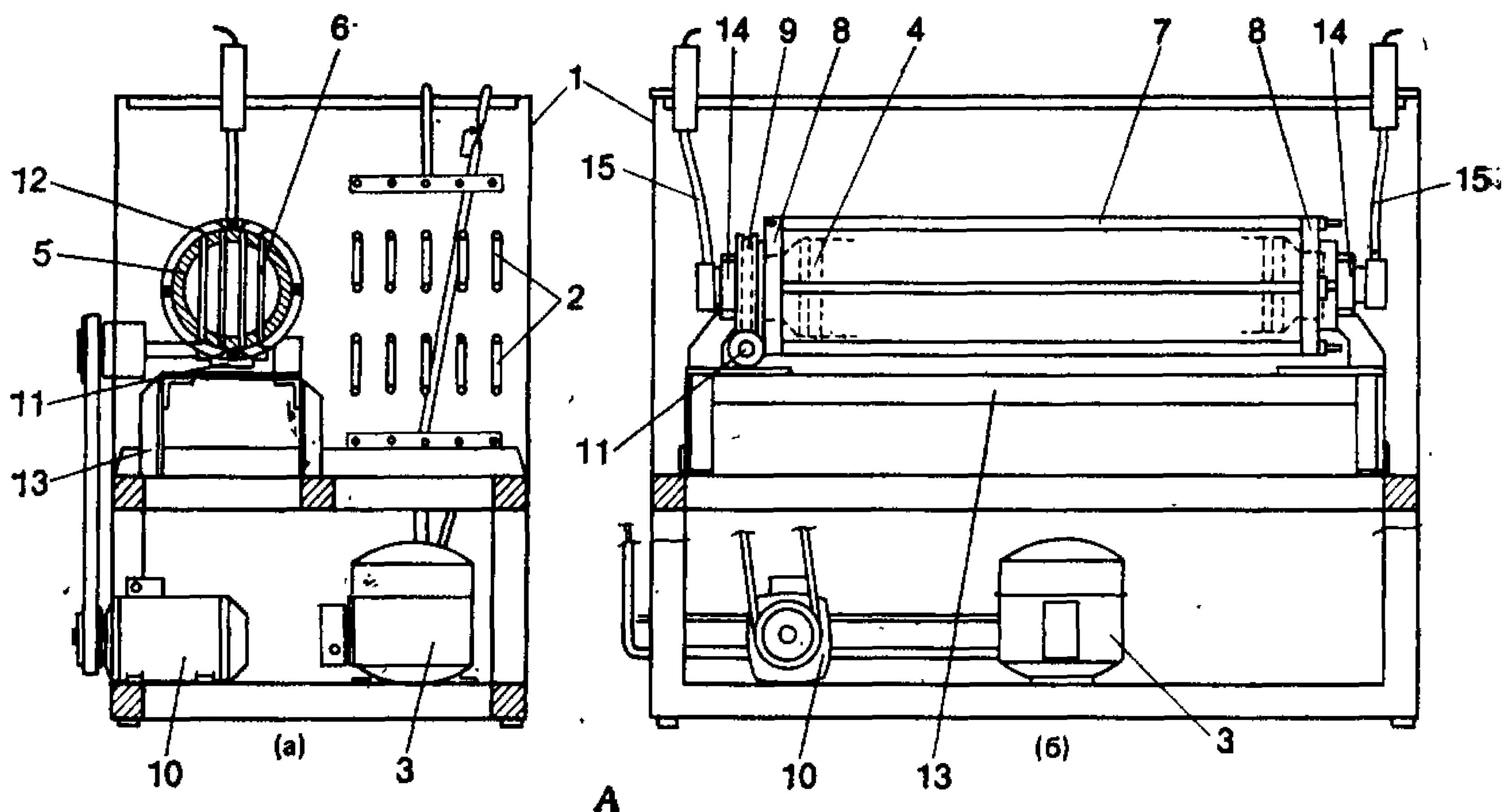
литом и католитом. Концы трубки закрыты диализной пленкой.

Обзор по применению электрофореза и ИЭФ в свободной жидкости опубликован Bours, 1976.

2.1.11. Многокамерные электролизеры

Как уже упоминалось, Рильбе и его сотрудники продолжили поиски в области традиционного стационарного электролиза с целью усовершенствования конструкции многокамерного аппарата (см. обзоры Svensson, 1948, и Rilbe, 1970). В 1974 г. в Милане Рильбе представил три новые разработанные им модели электролизеров: одну модель с открытыми ячейками, внутренней системой охлаждения, без перемешивания; вторую — с закрытыми ячейками, с системой внешнего охлаждения, с перемешиванием и третью, наиболее совершенную модель, сочетающую в себе большинство качеств хорошего электролизера. Конструктивные особенности последней модели позволяют успешно разрешить основную часть проблем стационарного электролиза, в частности, связанных с рассеянием тепла, электроосмосом, гомогенностью рабочего раствора во всех отсеках, сбором фракций без перемешивания сфокусированных компонентов. Весьма вероятно, что электролизеры этого типа удастся использовать для эффективного крупномасштабного фракционирования белков. Полное время стационарного электролиза в этом аппарате сокращено до 24 ч. Рабочий объем такого 20-камерного электролизера обычно составляет 500—1000 мл. Можно работать с достаточно высокими концентрациями белка — около 4—5%. Это означает, что «пропускная способность» аппарата достигает нескольких граммов белка в сутки. Этот подход, судя по всему, обладает существенными преимуществами по сравнению с другими препаративными приемами, основанными на применении градиента плотности (Rilbe et al., 1975).

В работе Jonsson, Rilbe, 1980, описана еще одна усовершенствованная модель электролизера, позволяющего фракционировать граммовые количества препарата. Аппарат состоит из 46 отсеков, разделенных мембранами. Полный рабочий объем — около 7,6 л, длина 1 м. Охлаждение и перемешивание жидкости внутри отсеков достигается за счет медленного вращения аппарата, помещенного в охлаждаемую камеру. Фракционирование происходит в течение 2—3 сут при напряжении до 5 кВ. Устройство всего аппарата, а также отдельно одного электродного отсека и примыкающей к нему разделительной ячейки показано на рис. 2.13, *А* и *Б*. С помощью этого электролизера удалось полностью разделить 14 г сывороточного белка на основные компоненты — сывороточный альбумин (pI 4,60), α-лактальбумин (pI 5,01) и β-лактоглобулин (pI 5,13—5,23). Впрочем, мне



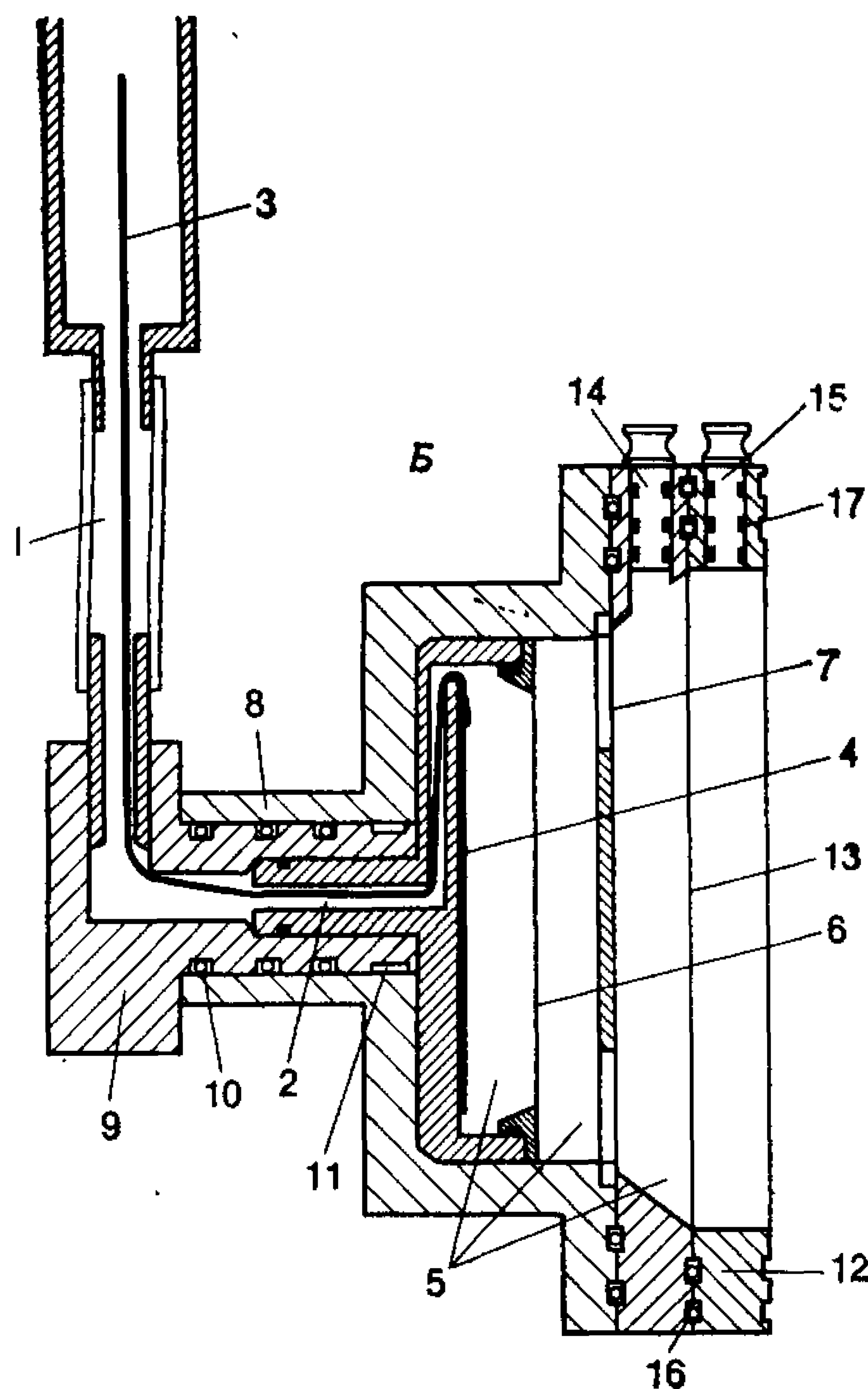


Рис. 2.13. *А*. Поперечный (а) и продольный (б) разрезы многокамерного электролизера. Основные узлы: 1 — камера охлаждения, 3 — рефрижераторная установка, 4 — разделительная камера электролизера, 7 — четыре крепежных стержня, фиксирующие разделительную камеру между двух торцевых колец (8), 10 — электромотор, вращающий разделительную камеру электролизера через систему червячной передачи (9 и 11), 13 — опорная рама, 14 — подшипники, 15 — газоотводные трубки. *Б*. Участок электролизера, примыкающий к одному из электродных отсеков (продольный разрез). 1 — газоотводная трубка, соединенная через канал (2) с электродным отсеком (5), 3 — платиновая проволока, ведущая к электроду (4), 6 — мембрана, препятствующая попаданию пузырьков выделяющегося газа в разделительную камеру, 7 — кольцевая перегородка, обеспечивающая равномерность распределения электрического поля в электролизере; подшипниковая система соединения вращающегося (8) и неподвижного (9) узлов, 10 — уплотнительные кольца, 11 — резиновая прокладка уплотнения электродного отсека, 12 — одно из 46 монтажных колец, образующих отдельные ячейки (камеры), разделенные между собой полупроницаемыми мембранами (13), 14 — отверстие для заполнения или опорожнения каждой отдельной ячейки с пробкой (15) и уплотнительными кольцами (17), 16 — концентрические уплотнительные кольца для герметизации стыков между отдельными ячейками. (Jonsson, Rilbe, 1980.)

кажется, что ввиду колоссальных размеров этого прибора, а также большого расхода дорогостоящих реактивов на сегодняшний день он скорее подходит для промышленных процессов, чем для работы в лаборатории.

2.1.12. *Высоковольтное ИЭФ в свободном потоке по Ханнигу*

Применение методов разделения в свободном потоке особенно эффективно при работе с очень большими количествами белков, разделение которых в обычном аппарате с неподвижной фазой потребовало бы многократного повторения процесса. Принцип электрофореза в непрерывном свободном потоке был впервые сформулирован в работе Barollier et al., 1958, и впоследствии разработан в работах Hannig, 1961, 1969, 1972. Раз-

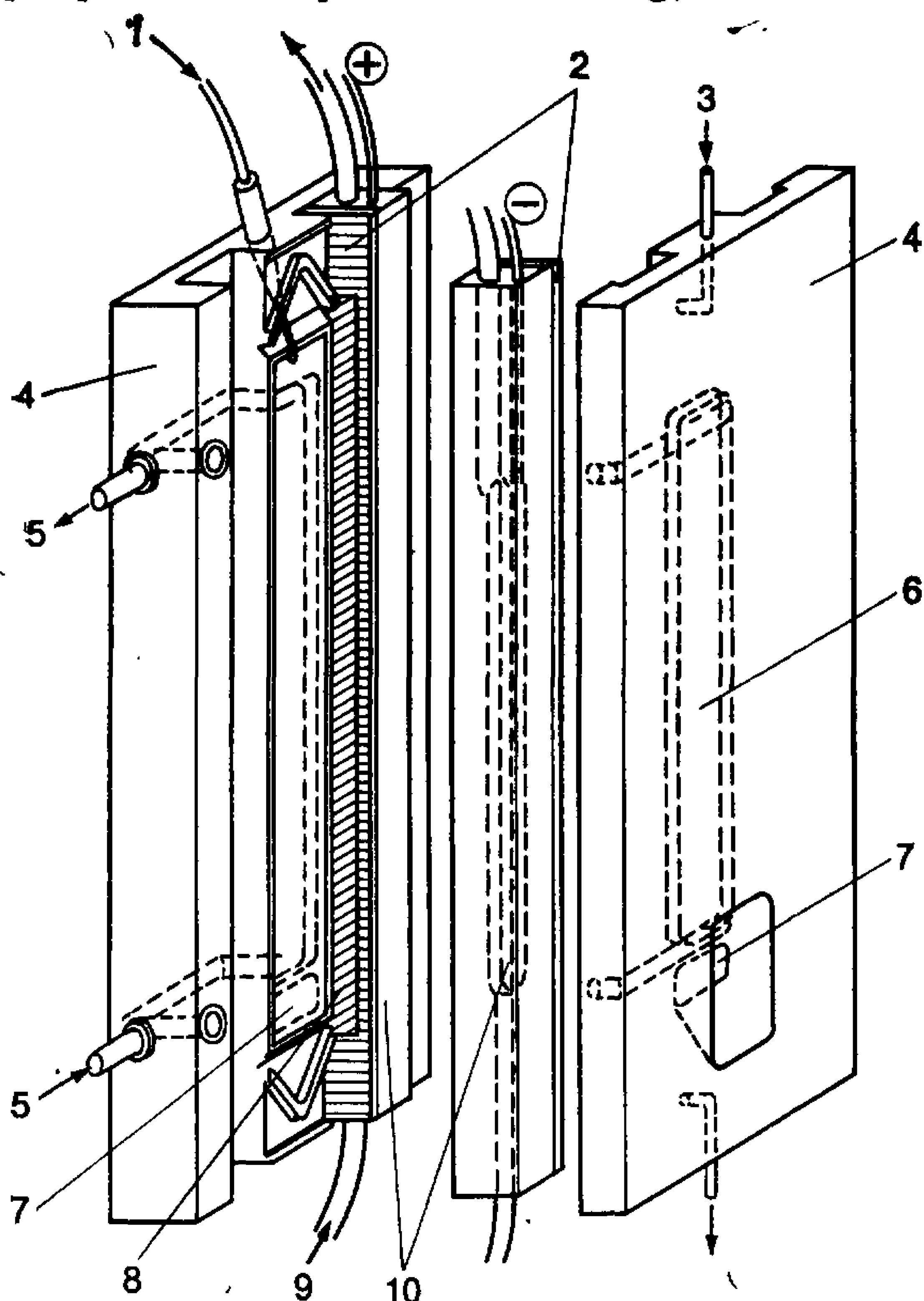


Рис. 2.14. Устройство разделительной камеры для аналитического электрофореза и ИЭФ в свободном потоке. 1 — внесение образца, 2 — уплотнительные прокладки, 3 — рабочий буфер, 4 — каркас, 5 — охлаждающая жидкость, 6 — рубашка охлаждения, 7 — кварцевое окошко, 8 — мембрана, 9 — электродный буфер, 10 — электродные каналы. (Hannig, 1978.)

делительная камера в аппарате Ханнига образована двумя параллельными стеклянными пластинами (50×50 см на расстоянии 0,3—0,5 мм друг от друга), между которыми движется непрерывный ламинарный слой электролита. Здесь не предусмотрено никакой специальной системы антиконвекционной стабилизации, электрофорез проводится в свободной жидкости. Такой прибор использовался главным образом для электрофореза белков, целых клеток, клеточных органелл и мембранных компонентов. Недавно сообщалось о его использовании для ИЭФ эритроцитов (McGuire et al., 1980).

В работе Hannig, 1978, описана конструкция другой проточной камеры меньшего размера со встроенным сканирующим денситометром, что позволяет регистрировать положение зон и автоматически определять их подвижность. Камера в разобранном виде изображена на рис. 2.14. В ячейке (12×12 см) сверху вниз движется ламинарный слой буфера толщиной 0,3 мм. Электрическое поле (с напряженностью до 200 В/см) приложено в направлении, перпендикулярном потоку жидкости. Образец непрерывно подается в верхнюю часть камеры и вносится в поток буфера. В той же работе Ханнига было описано применение этой системы для ИЭФ овечьих гемоглобинов. Скорость потока жидкости в этой системе слишком велика по сравнению со скоростью фокусирования, поэтому один и тот же раствор приходилось многократно пропускать через камеру до полного установления равновесия. Аналогичный прием был использован в системе циклического ИЭФ, разработанной группой Бьера (разд. 2.1.15).

2.1.13. Высоковольтное ИЭФ в свободном потоке по Джасту и Вернеру

В устройстве, предложенном Seiler et al., 1970 a, b, используется неплоская вертикальная разделительная ячейка. Ячейка, изображенная на рис. 2.15, представляет собой U-образный канал, образованный блоками из оргстекла, охватывающими с трех сторон центральную охлаждаемую металлическую пластину с тефлоновым покрытием. Электродные блоки, в которых расположены электродные камеры, находятся позади металлической пластины. Блоки фиксируются крепежными болтами и образуют очень компактную систему. В переднем блоке и электродном блоке отверстия для крепежных болтов широкие (без резьбы), что позволяет с помощью различных прокладок варьировать толщину разделительного канала. Размеры канала — 36 см в длину, 11 см в ширину. Толщина канала обычно около 0,5 мм. Конструкция предусматривает простоту сборки электродных отсеков. Полупроницаемая мембрана плотно прижимается

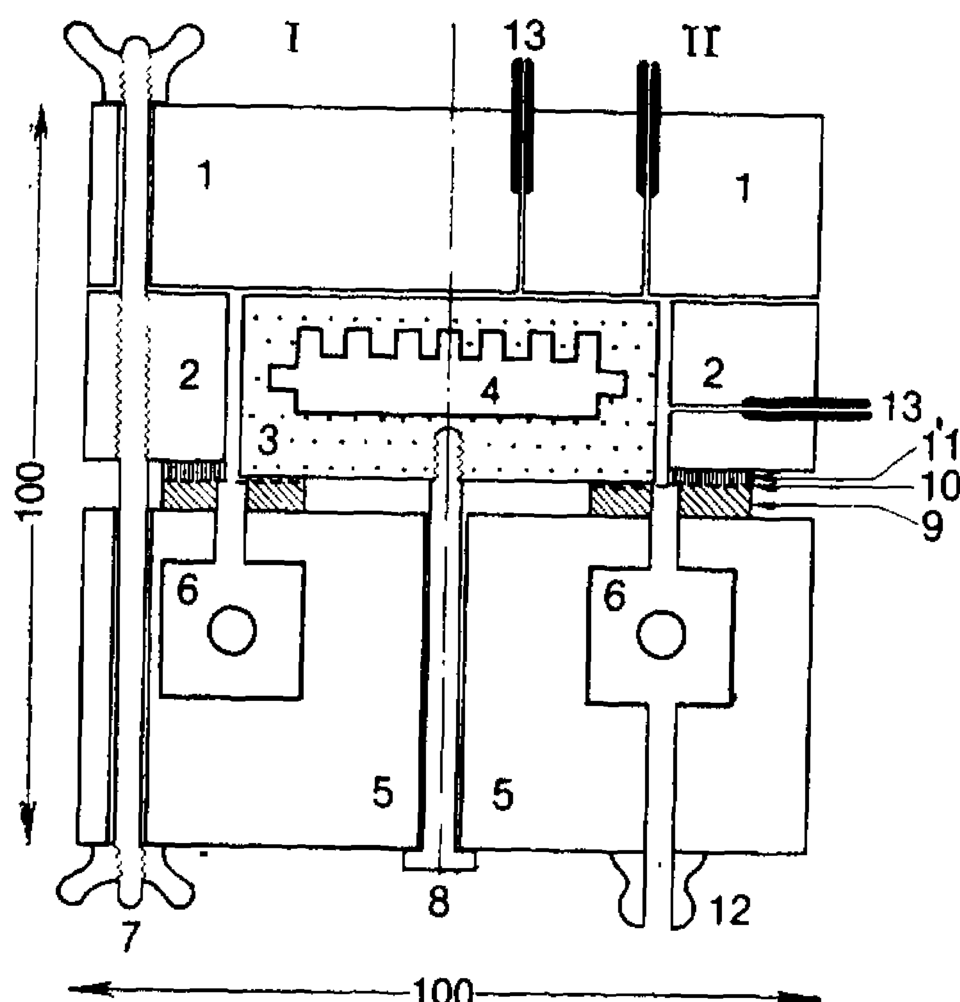


Рис. 2.15. Устройство для изоэлектрофокусирования в свободном потоке. Показаны сечения двумя параллельными плоскостями на глубине 1 см (I) и на глубине 2 см (II). 1 — передний и 2 — боковые блоки разделительной ячейки, 3 — алюминиевый блок охлаждения, 4 — полость для циркуляции охлаждающей жидкости, 5 — электродные блоки, 6 — электродные отсеки с электродами, 7 — крепежный болт, 8 — винт, регулирующий плотность прижима блоков (5) к прокладке (9) из силиконированного каучука, 10 — электродные мембраны, 11 — резиновые прокладки, регулирующие толщину канала, 12 — ввод электродного буфера, 13 — ввод в разделительную камеру рабочего буфера. (Seiler et al., 1970a.)

прокладкой из силиконовой резины с образованием герметичного стыка. С помощью капилляров, соединенных с перистальтическим насосом, со дна ячейки собирают до 48 фракций. В качестве анолита и католита используют 5%-ную уксусную кислоту и 1,5%-ный этаноламин соответственно, которые в процессе ИЭФ постоянно прокачивают через электродные отсеки. Температура в разделительной ячейке контролируется термистором. Фракционирование обычно проводят при напряженности поля 110 В/см и скорости потока жидкости 1 мл/мин.

Опубликованы обширные сведения об использовании этой системы для разделения клеток и субклеточных органелл (Just et al., 1975 a, b; Just, Werner, 1977 a, b, 1979). Например, удалось разделить смесь эритроцитов человека, мыши и кролика в градиентах pH 3—10 и 5—7 при непрерывной подаче смеси со скоростью $3 \cdot 10^7$ клеток/мин. Время прохождения клеток по всему пути разделения составляло лишь 7 мин. Для предотвращения слипания клеток использовали 1 мМ ЭДТА. Сообщались также предварительные данные по фракционированию легкой мито-

хондриальной фракции на лизосомы и собственно митохондрии. В этом случае для предотвращения агрегации использовали различные полианионные вещества, такие, как гепарин, хондроитинсульфат, поливинилсульфат, декстрансульфат и полианетолсульфоновую кислоту. Несмотря на многочисленные данные этих авторов, а также данные Sherbert, 1978, процесс ИЭФ клеток нельзя считать полностью отработанным (Righetti et al., 1980 b). Так, сообщалось, что при ИЭФ амфолиты-носители могут связываться с поверхностью клеток (McGuire et al., 1980). Есть сведения о том, что в процессе ИЭФ лимфоциты из селезенки мыши утрачивают жизнеспособность и подвергаются лизису (Castimpoolas, Griffith, 1980).

2.1.14. Высоковольтное ИЭФ в свободном потоке по Прусику

В работе Prusik, 1974, описан прибор для ИЭФ в непрерывном свободном потоке, имеющий более традиционную конструкцию. Фактически он является вариантом аппарата, предложенного в работе Hannig, 1961, модифицированным для проведения ИЭФ (рис. 2.16). Раствор амфолитов-носителей прокачивают через горизонтальную разделительную ячейку, в которой образуется слой толщиной 0,5 мм, шириной 50 см, с эффективной длиной пути 44 см. Охлаждение осуществляется потоком холодного воздуха, что дает возможность рассеивать тепло, выделяющееся при мощности тока 0,36 Вт/см. На первом этапе проводят предварительное фракционирование амфолитов-носителей. Затем полученные фракции разливают в шесть резервуаров, расположенных на вводе ячейки, и в один из них добавляют разделяемую смесь белков. При использовании предварительно фракционированных амфолитов градиент pH формируется значительно быстрее, что позволяет сократить время фокусирования белков. Во избежание тепловой конвекции, которой способствует неравномерное выделение джоулева тепла, ячейка должна быть расположена горизонтально. Использование широкой ячейки (ширина 50 см) обусловлено тем, что при достаточно большой длине пути разделения процесс установления равновесия ИЭФ оказывается весьма продолжительным. Так, при фракционировании панкреатической амилазы свиньи в градиенте pH 5—8 (0,3% амфолины) время нахождения белка в ячейке составляло 150 мин при падении напряжения 60 В/см.

В заключение отметим, что в продажу поступают аппараты для электрофореза в свободном потоке различной конструкции: модель с широкой горизонтальной ячейкой, а также модели как с широкой, так и с узкой вертикальными ячейками. С небольшими модификациями все они, вероятно, могут быть приспособ-

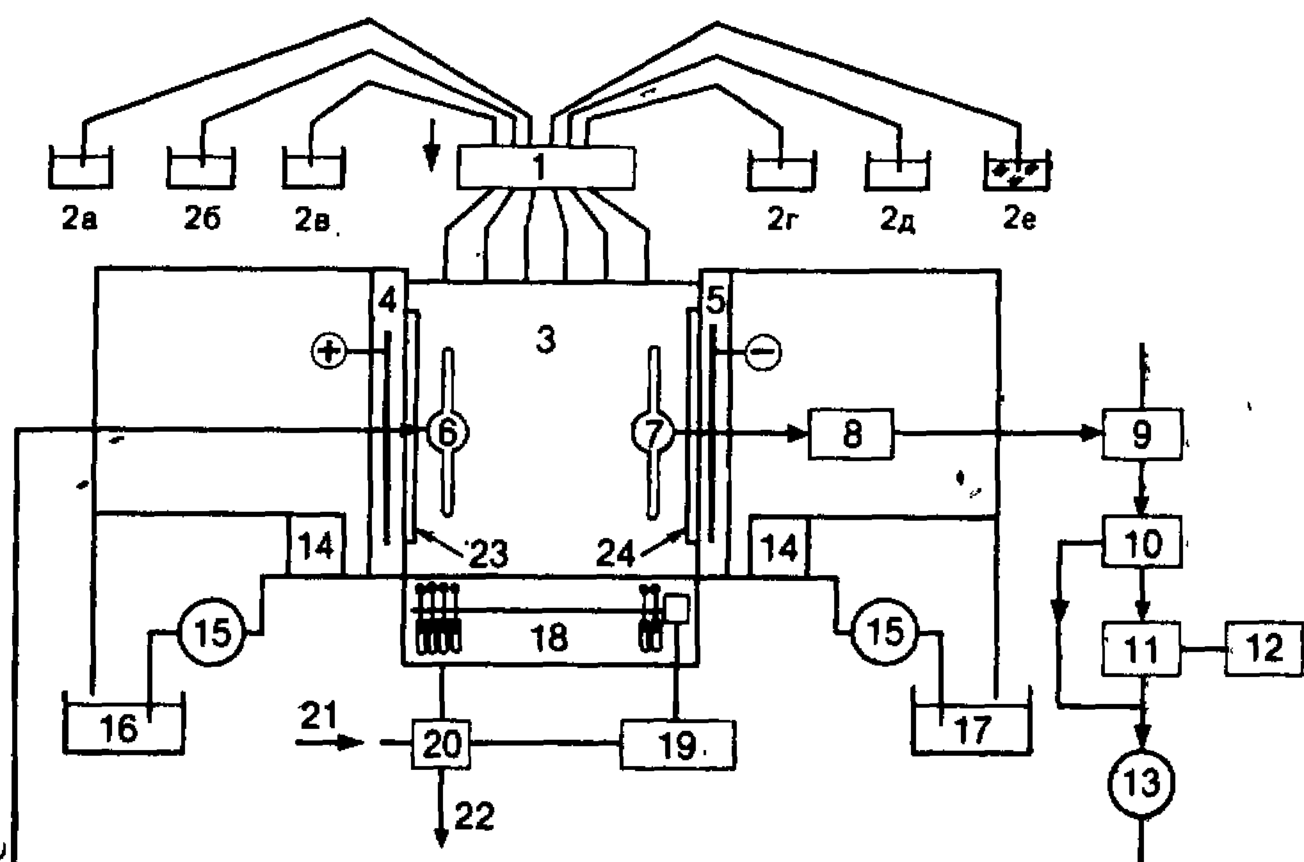


Рис. 2.16. Схематическое изображение системы ИЭФ в свободном потоке с предварительным фракционированием амфолитов-носителей. 1 — насос, подающий рабочий раствор в разделительную камеру, 2 — резервуары с фракциями предварительно сфокусированных амфолинов, 2е — одна из фракций, дополнительно содержащая образец (раствор белка), 3 — щелевая разделительная камера, 4 — анодный отсек, 5 — катодный отсек, 6 и 7 — вход и выход системы воздушного охлаждения, 8 — температурный детектор, 9 — пневмоусилитель, 10 — смеситель, 11 — теплообменник, 12 — охлаждающее устройство, 13 — вентилятор, 14 — стабилизатор уровня жидкости, 15 — центробежный насос, 16 — резервуар с анолитом (кислотой), 17 — резервуар с католитом (щелочью), 18 — коллектор фракций, 19 — коротковолновый детектор, 20 — воздушный клапан, 21 — соединение с атмосферой, 22 — к насосу, 23, 24 — ионообменные мембраны. (Prusik, 1974.)

лены для проведения ИЭФ. Как правило, оказывается необходимым обеспечить независимую циркуляцию католита и анолита, а в некоторых моделях — снизить скорость протекания раствора через ячейку для достижения равновесия ИЭФ.

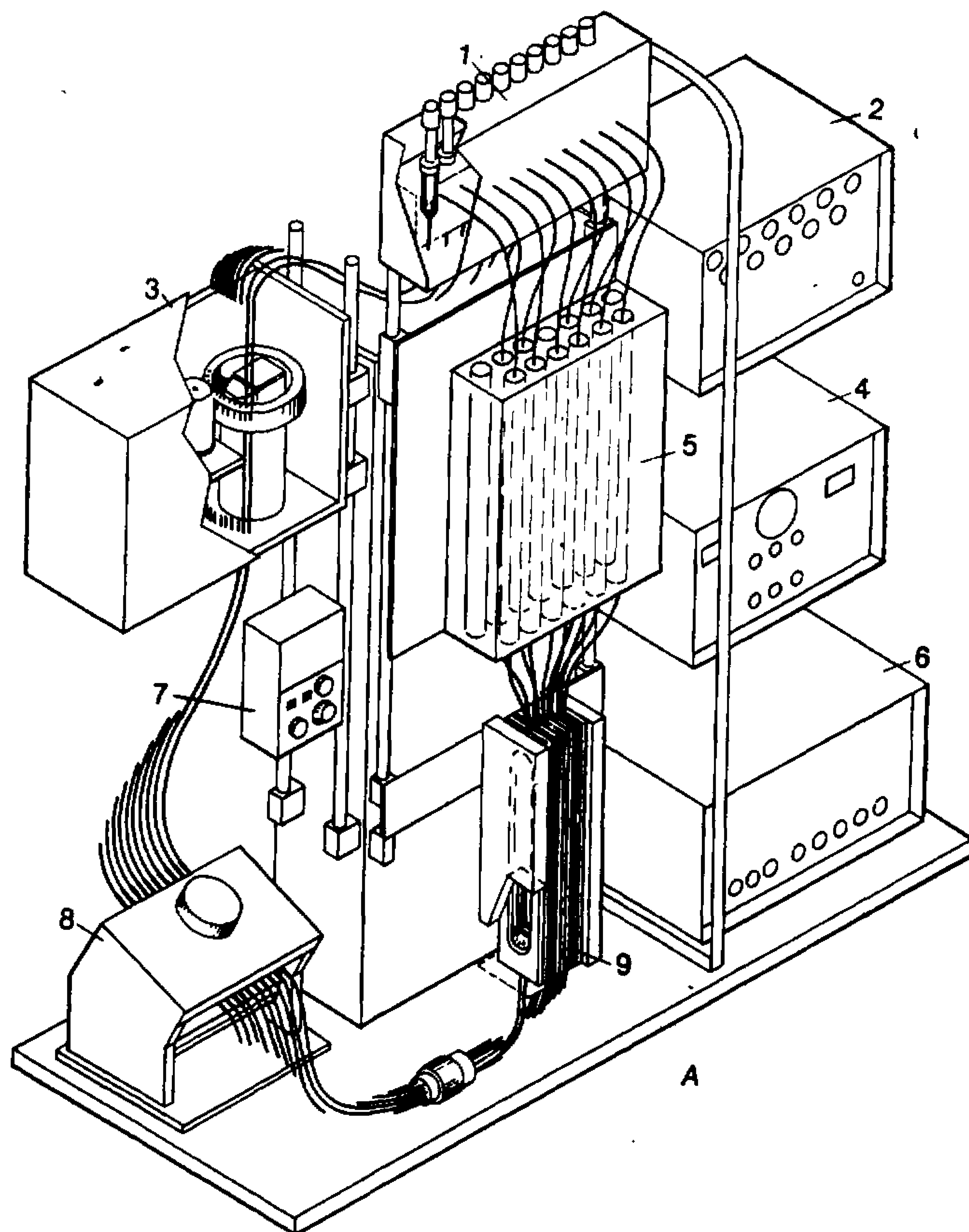
2.1.15. Циклическое ИЭФ в непрерывном потоке

Сущность этого нового подхода, названного циклическим ИЭФ («recycling IEF»), была описана в работах Egen et al., 1979; Bier, Egen, 1979, и Bier et al., 1979. Известно, что для методов разделения в свободном потоке (Fawcett, 1973), имеющих большое значение для крупномасштабного препаративного фракционирования, характерны искажения, связанные с электроосмосом, параболическим профилем ламинарного течения и конвекцией, вызванной неравномерным выделением тепла. Для сведения этих искажений к минимуму была разработана усовершенствованная система (Egen et al., 1979), в которой миниатюрная разделительная камера пространственно отделена от резер-

вуара с образцом и системы охлаждения. Объем последней, таким образом, может быть сколь угодно велик. Образец подается в короткую фокусирующую камеру (расстояние между анодом и катодом всего 3 см), рабочее пространство которой разделено на узкие отсеки с помощью системы пластинчатых фильтров, расположенных параллельно электродам и параллельно потоку жидкости. При ИЭФ в такой камере удается значительно снизить неблагоприятное влияние ламинарного течения, электроэндосмоса и конвекции. При циклическом методе разделения разделяемую смесь многократно пропускают через фокусирующую камеру, а после выхода из камеры каждый раз охлаждают, пропуская через расположенную отдельно систему охлаждения. Это позволяет работать при достаточно высокой загрузке образцом. Каждый отдельный цикл прохождения раствора через камеру сопровождается только небольшим продвижением разделяемых компонентов по направлению к области своих pI. Однако при многократном повторении процесса в конце концов достигается стационарное состояние; характерное для ИЭФ. Камера имеет 10 входных и 10 выходных каналов (по числу отсеков). После выхода жидкости из камеры в каждом канале регистрируется pH (с помощью 10 микроэлектродов) и УФ-поглощение (с помощью десяти фотоэлементов). Работа системы контролируется и управляется компьютером. Устройство всей системы и отдельно проточной фокусирующей камеры показано на рис. 2,17,*А* и *Б*. Манипулируя скоростью потока в крайних каналах, компьютер может регулировать наклон градиента pH, и в частности противодействовать катодному дрейфу, который проявляется в неэлектрофоретическом смещении сфокусированных зон в сторону катода. На сегодня данная модель представляет собой наиболее изощренную систему препаративного изоэлектрического фракционирования. В продаже имеется вариант такой системы производства американской фирмы Ionics Inc., Watertown, Boston (Mass. USA).

2.1.16. Проточное ИЭФ в градиенте плотности

Другой подход . к крупномасштабному препаративному ИЭФ — это разделение в непрерывном потоке градиента плотности. Впервые этот подход был использован для препаративного электрофореза (Mel, 1960, 1964). Предложенная автором система включала горизонтальный разделительный канал длиной 30 см, высотой 3 см и шириной 0,7 см. Электродные отсеки, расположенные сверху и снизу, были отделены от разделительного канала диализными мембранами. Рабочие растворы электролита с различным содержанием сахарозы подавались в канал через 12 входных трубок. После прохождения по каналу в на-



правлении, перпендикулярном направлению электрического поля, поток жидкости, стабилизированный вертикальным градиентом плотности, вновь делился на фракции системой выходных трубок.

Впоследствии в работах Fawcett, 1973 и 1976, были предложены две модифицированные модели аппаратов этого типа — с большей и меньшей длиной пути разделения. Первая из них состояла из двух охлаждающих пластин, образующих разделительную камеру высотой 25, длиной 23 и шириной 0,3 см. Градиент плотности поступал в камеру с одной стороны через систему из 54 трубок, равномерно распределенных по высоте камеры. Горизонтальный поток жидкости создавался 108-канальным перистальтическим насосом, который контролировал скорость потока и на входе, и на выходе из камеры.

Устройство второй модели показано на рис. 2.18. Корпус (1) камеры (длина 20 см) сделан из оргстекла. Рабочее пространство камеры разделено на три отсека перегородками (2). Сужа-

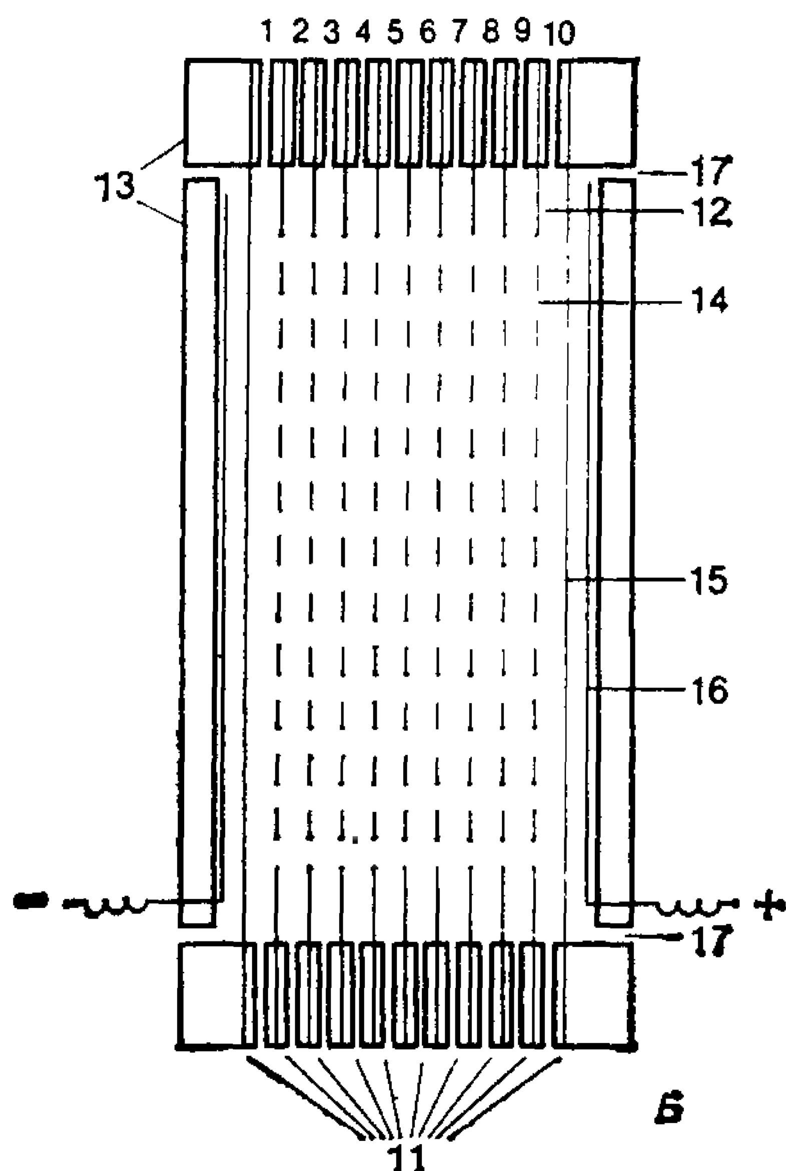


Рис. 2.17. *А*. Схематическое изображение аппарата для циклического ИЭФ. После выхода из блока охлаждения 10 фракций проходят через проточные блоки измерения pH (10 электродов) и УФ-поглощения (10 микроячеек). Затем они с помощью многоканального насоса подаются в компактную фокусирующую камеру (размер каждого отсека 20×2×0,2 см), а после этого — снова в блок охлаждения. 1 — pH-метр, 2 — система контроля, 3 — УФ-детектор, 4 — источник питания, 5 — блок охлаждения, 6 — управление УФ-детектором, 7 — управление насосом, 8 — насос, 9 — фокусирующая ячейка. [M. Bier, N. B. Egen, T. T. Algyer, G. E. Twitty, R. A. Mosher; In: Peptides: Structure and Biological Function (Gross I., Meienhofer J., eds.), Pierce Chemicals Co., Rockford II, 1979, pp. 79—89]. *Б*. Поперечное сечение разделительной ячейки для циклического ИЭФ. 1—10 — разделительные каналы, 11 — выводы на многоканальный насос, 12 — прокладки из оргстекла («спейсеры»), 13 — пластиковая панель (наружный каркас проточной камеры, 14 — пластинчатые фильтры (из поливинилхлорида, расположенные между каналами внутри камеры), 15 — диализная мембрана, отделяющая электродный отсек, 16 — платиновые проволочные электроды, 17 — вход и выход системы циркуляции электролитов. (Egen et al., 1979.)

ющиеся книзу перегородки зафиксированы на расстоянии 1,5 мм от дна камеры, покрытого тонким слоем пластика (3). Эффективность системы охлаждения обеспечивается хорошим термическим контактом между пластиком и охлаждающим горизонтальным алюминиевым блоком (4). Два крайних отсека содержат «тяжелый» электродный раствор, а центральный — рабочий раствор с вертикальным градиентом плотности. Вход и выход градиентного потока контролируется многоканальным насосом, соединенным через систему капилляров с рядом отверстий, рас-

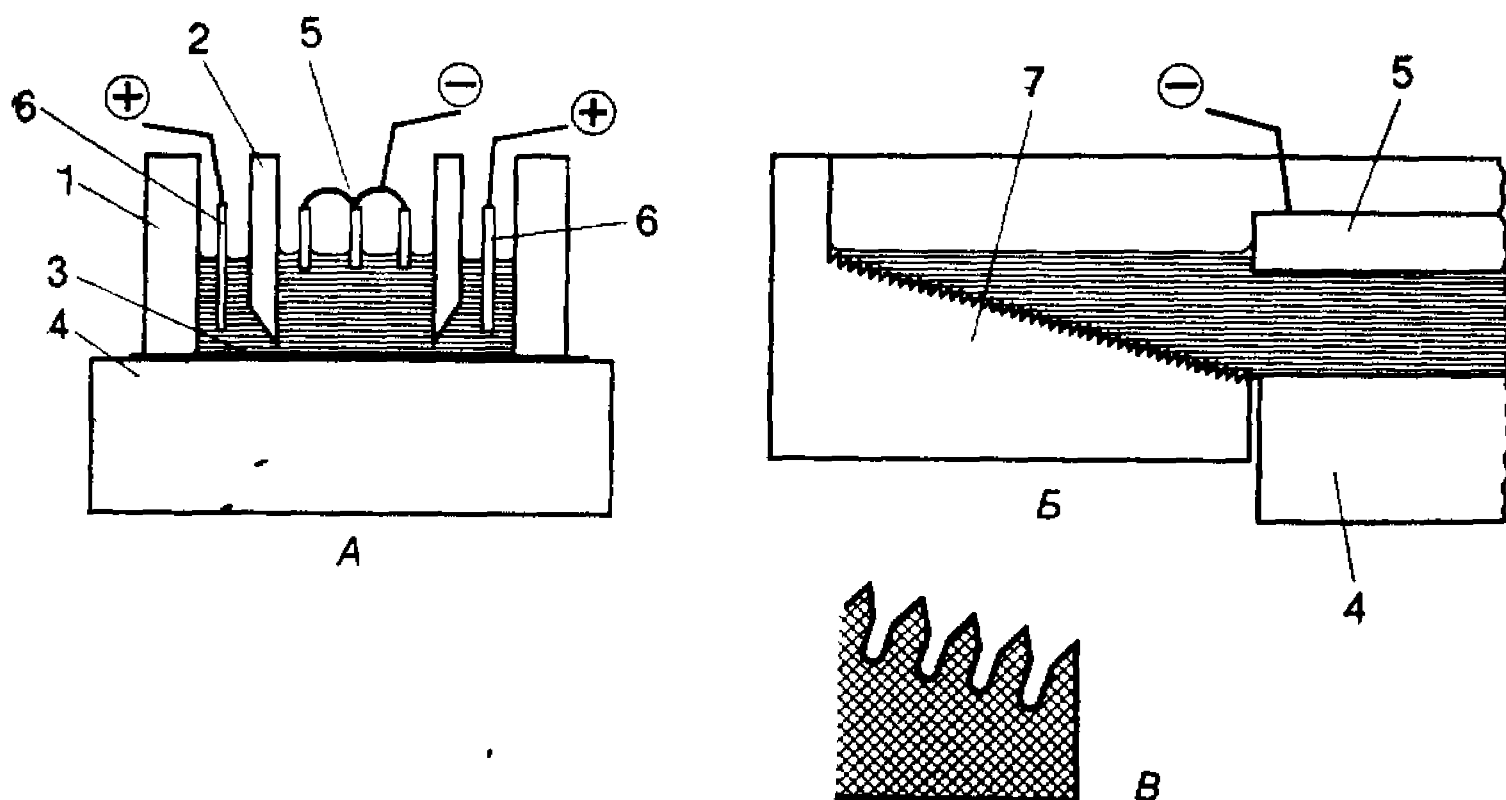


Рис. 2.18. Модель аппарата для ИЭФ в проточном градиенте плотности с малой длиной пути разделения. *А*. Поперечное сечение горизонтальной рабочей камеры (1), разделенной на три отсека перегородками (2). Дно камеры покрыто тонким слоем пластика (3), контактирующим с блоком охлаждения (4). Катодные пластинки (5), сделанные в виде проволочной сетки из нержавеющей стали, погружены в верхний слой проточного градиента плотности в центральном отсеке. Анодные пластинки (6) из платиновой проволочной сетки погружены глубоко в жидкость в обоих крайних отсеках. *Б*. Продольное сечение торцевого участка камеры с гофрированным распределительным блоком (7) для подачи и вывода проточного градиента плотности. *В*. Желобки распределительного блока. (Fawcett, 1976.)

положенных в распределительных блоках по обе стороны камеры. Отверстия находятся в нижней части желобков, образованных гофрированной поверхностью обоих распределительных блоков (7). Эта система позволяет плавно подавать и выводить из камеры слои градиента толщиной около 0,25 мм. Поскольку охлаждение раствора происходит только через дно камеры, образуется вертикальный температурный градиент, который, как и предполагалось в работе Philpot, 1940, дополнительно стабилизирует проточный градиент плотности. Согласно данным Fawcett, 1976, в таком приборе можно фракционировать до 1—2 г смеси белков в час. Несмотря на такие уникальные препаративные характеристики, в литературе нет других сообщений об использовании этого прибора, хотя его конструкция представляется мне простой и весьма совершенной.

2.1.17. Стационарный реоэлектролиз

Недавно в работе Rilbe, 1978, был описан совершенно новый подход к изоэлектрическому фракционированию, названный «стационарным реоэлектролизом». С его помощью оказывается возможным формирование стабильного градиента pH за счет

стационарного электролиза обычных буферных растворов в сочетании с дополнительным внешним переносом жидкости между катодным и анодным отсеками. Принцип действия такой системы проиллюстрирован на рис. 2.19. Разделение происходит в неподвижной жидкости, находящейся в центральном отсеке. В то же время и анолит, и католит непрерывно перемешиваются. При помощи двухканального насоса происходит постоянный взаимный обмен растворами между электродными отсеками. Скорость работы насосов подбирается таким образом, чтобы гидродинамический поток полностью компенсировал электрофоретический транспорт всех ионов электролитов. Если постоянство электрофоретического и гидродинамического потоков поддерживается вплоть до установления стационарного состояния, то в разделительной камере между электродами устанавливается стабильный плавный градиент pH.

Были проведены расчеты, позволившие предсказать форму градиента pH для реоэлектролиза в случае солевого буфера, образованного слабой кислотой и сильным основанием или, наоборот, сильной кислотой и слабым основанием. Теоретический расчет для случая буфера на основе слабой кислоты и слабого основания с $\Delta pK=1$ указывает, что должен сформироваться плавный градиент протяженностью в 2—2,5 ед. pH, центр которого будет располагаться посередине между двумя значениями pK. Экспериментально удавалось получать градиенты pH 4—5 и 8,5—9,5 при стационарном реоэлектролизе ацетатного и боратного буферов соответственно.

Аналогичный подход был описан в работе Martin, Hampson, 1978. Они использовали электролизер многокамерного типа, в котором разделительные мембраны были покрыты слоем амфо-

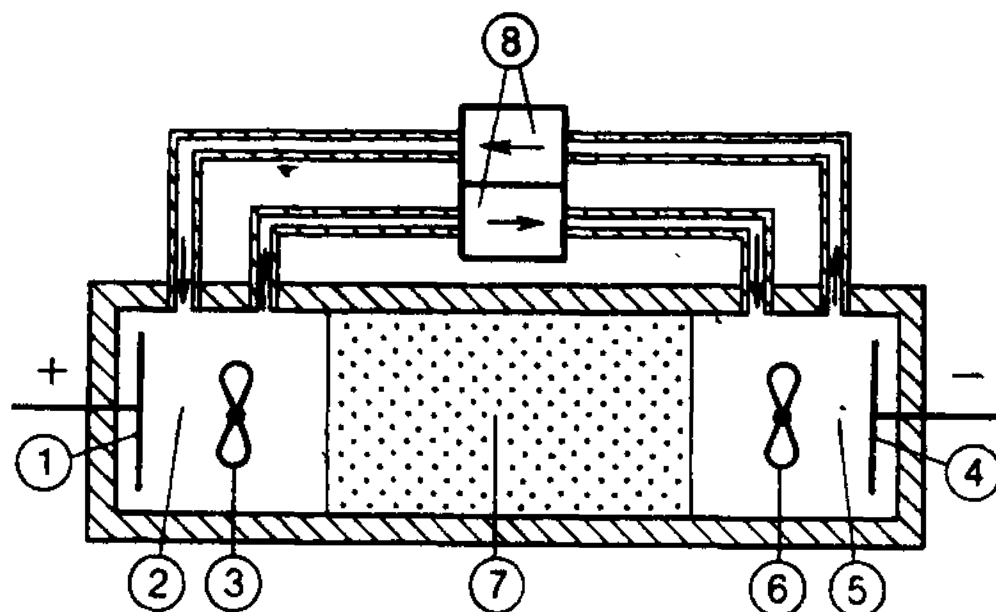


Рис. 2.19. Иллюстрация принципа стационарного реоэлектролиза, основанного на непрерывном встречном переносе жидкости между анолитом (2) и католитом (5). Фракционирование происходит в покоящейся жидкости (7). В электродных отсеках жидкость непрерывно перемешивается с помощью мешалок (3) и (6). Двухканальный насос (8) с одинаковой скоростью перекачивает растворы от анодного отсека к катодному и обратно. 1 — анод, 4 — катод. (Rilbe, 1978.)

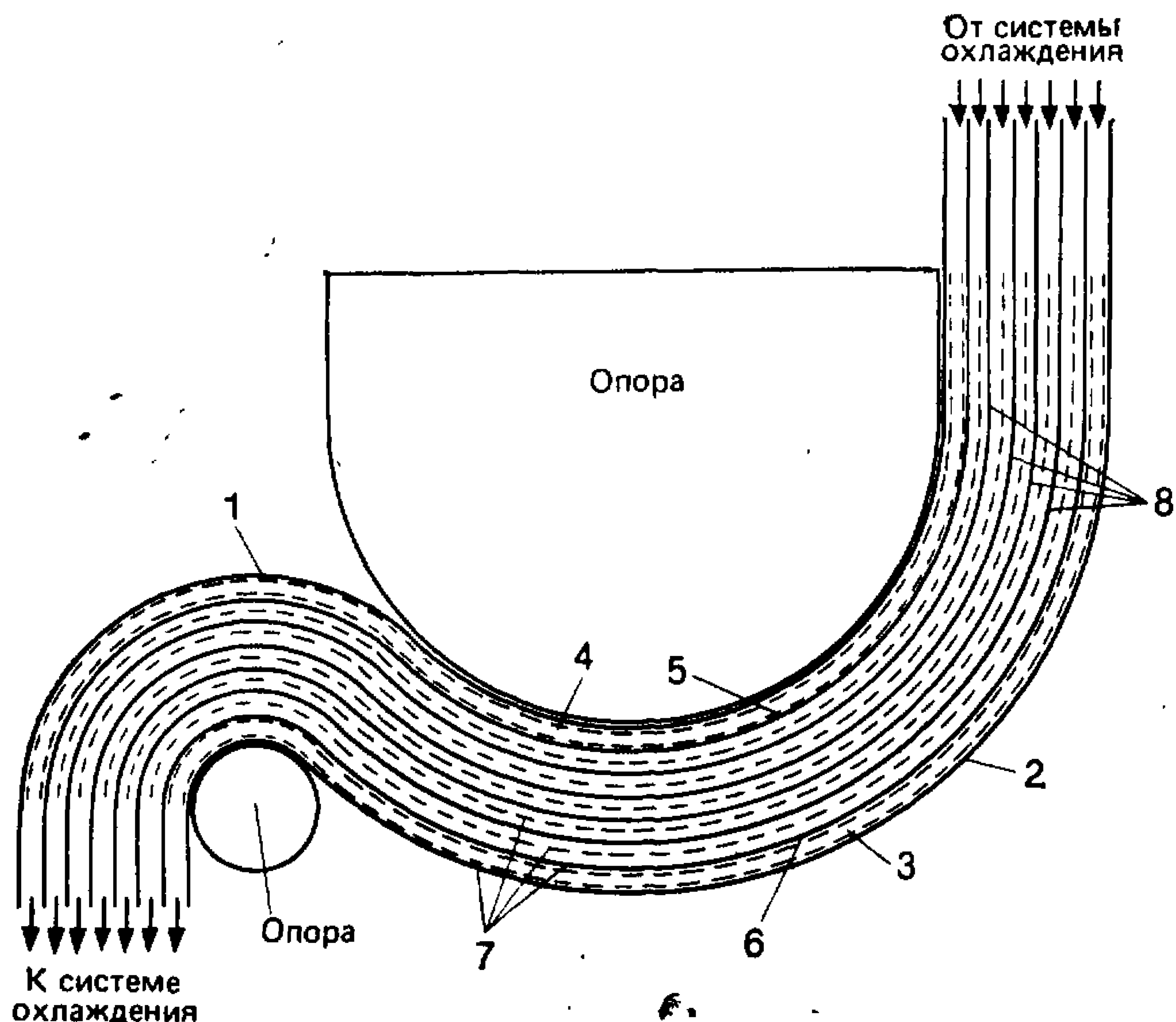


Рис. 2.20. Поперечное сечение прибора, разработанного Martin, Hampson, 1978. 1 и 2 — непроницаемая пластиковая пленка, растянутая между опорами для обеспечения тесного контакта между мембранами, 3 — катод, 4 — анод, 5 — катионообменная мембрана, 6 — анионообменная мембрана, 7 — разделительные сетки, 8 — мембраны, находящиеся в изоэлектрическом состоянии.

терных веществ и функционировали в условиях, обеспечивающих их изоэлектрическое состояние. Устройство этого аппарата показано на рис. 2.20. Несмотря на то что по конструкции он принципиально отличается от системы Рильбе, процесс образования и поддержания стационарного градиента pH и в этом случае, по существу, основан на принципе стационарного реоэлектролиза. Для обеих систем были выведены аналогичные уравнения, описывающие стационарное состояние процесса. В обоих случаях удается получить аналогичные рабочие диапазоны pH. Как сказано в статье Martin, Hampson, 1978, «при использовании моновалентных буферных ионов ширина рабочего диапазона pH находится в пределах 1,5 ед. pH в том случае, когда только один из ионов обладает буферными свойствами, и в пределах 3,5 ед. pH, когда оба иона обладают буферными свойствами, при соответствующем интервале между значениями р*K* двух буферных групп».

С поступлением обеих систем в продажу перед экспериментатором могли бы открыться поистине неограниченные возможности. Совсем недавно появилось сообщение об использовании еще одного варианта процесса, сочетающего особенности двух

систем и основанного на применении двухкомпонентных буферных растворов для фракционирования в многокамерном электролизере (Jonsson, Fredriksson, 1981).

2.2. Препаративное ИЭФ в гелях

2.2.1. Проточное ИЭФ по Фоусетту

Горизонтальные системы фракционирования в проточном градиенте плотности (Fawcett, 1973, 1976) уже рассматривались в разд. 2.1.15. Фоусетт разработал также конструкцию вертикальной проточной камеры, заполненной сефадексом в качестве антиконвекционной среды. Следует отметить, что если для работы в горизонтальном потоке необходимо достаточно сложное оборудование, то устройство вертикальной системы, напротив, отличается простотой исполнения. В одном из вариантов метода, описанном в работе Gianazza et al., 1975, фракционирование синтетических амфолитов проводили в камере, имеющей только 12 выходных каналов и не оснащенной системой циркуляции электродных растворов. Фракционирование могло продолжаться безостановочно в течение нескольких недель, не требуя почти никакого контроля со стороны экспериментатора. Непрерывная подача образца обеспечивалась за счет постоянного гидростатического напора жидкости в колбе Мариотта. Метод Фоусетта основан на принципе проточного электрофореза, который был впервые описан в работе Svensson, Brattsten, 1949, и Grassman, 1950. Различие между методами проточного ЭФ и ИЭФ проиллюстрировано на рис. 2.21.

Разделительная фокусировочная камера образована двумя охлаждаемыми пластинами (23×30 см), расположенными на

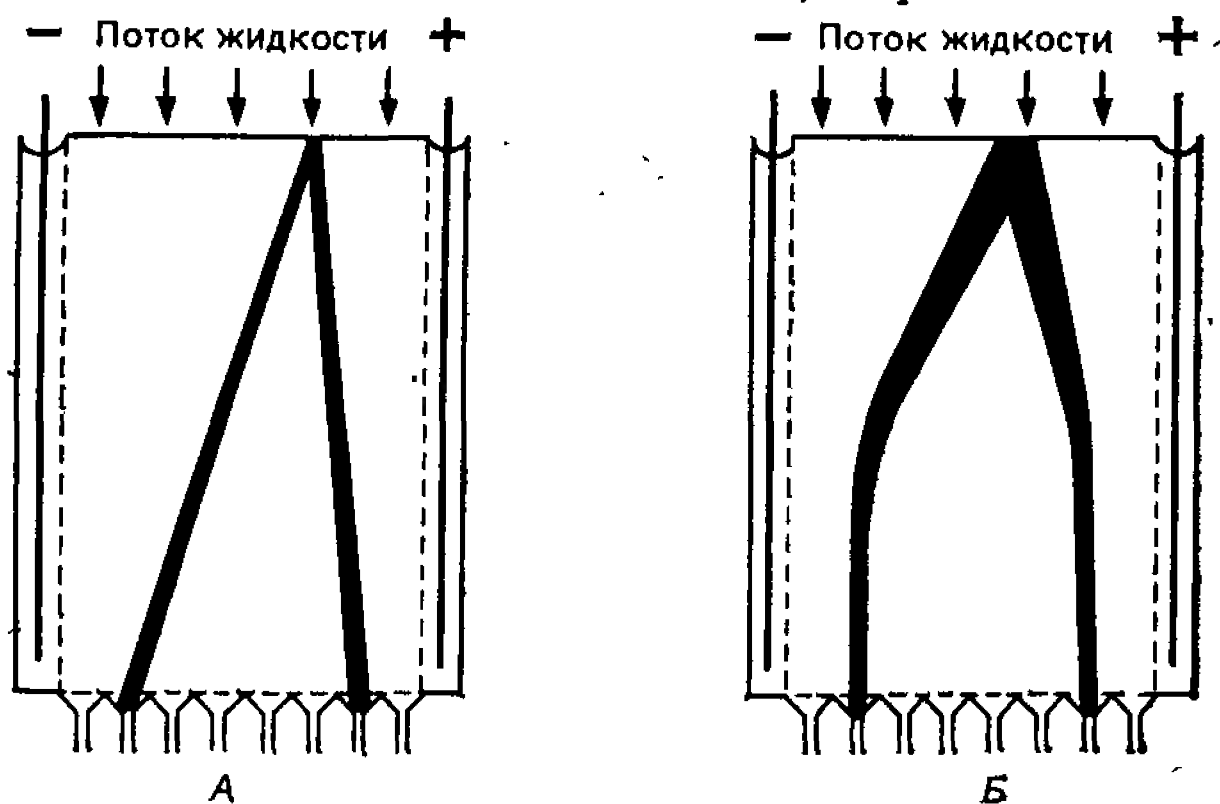


Рис. 2.21. Иллюстрация принципов проточного электрофореза (*А*) и проточного ИЭФ (*Б*). (Fawcett, 1973.)

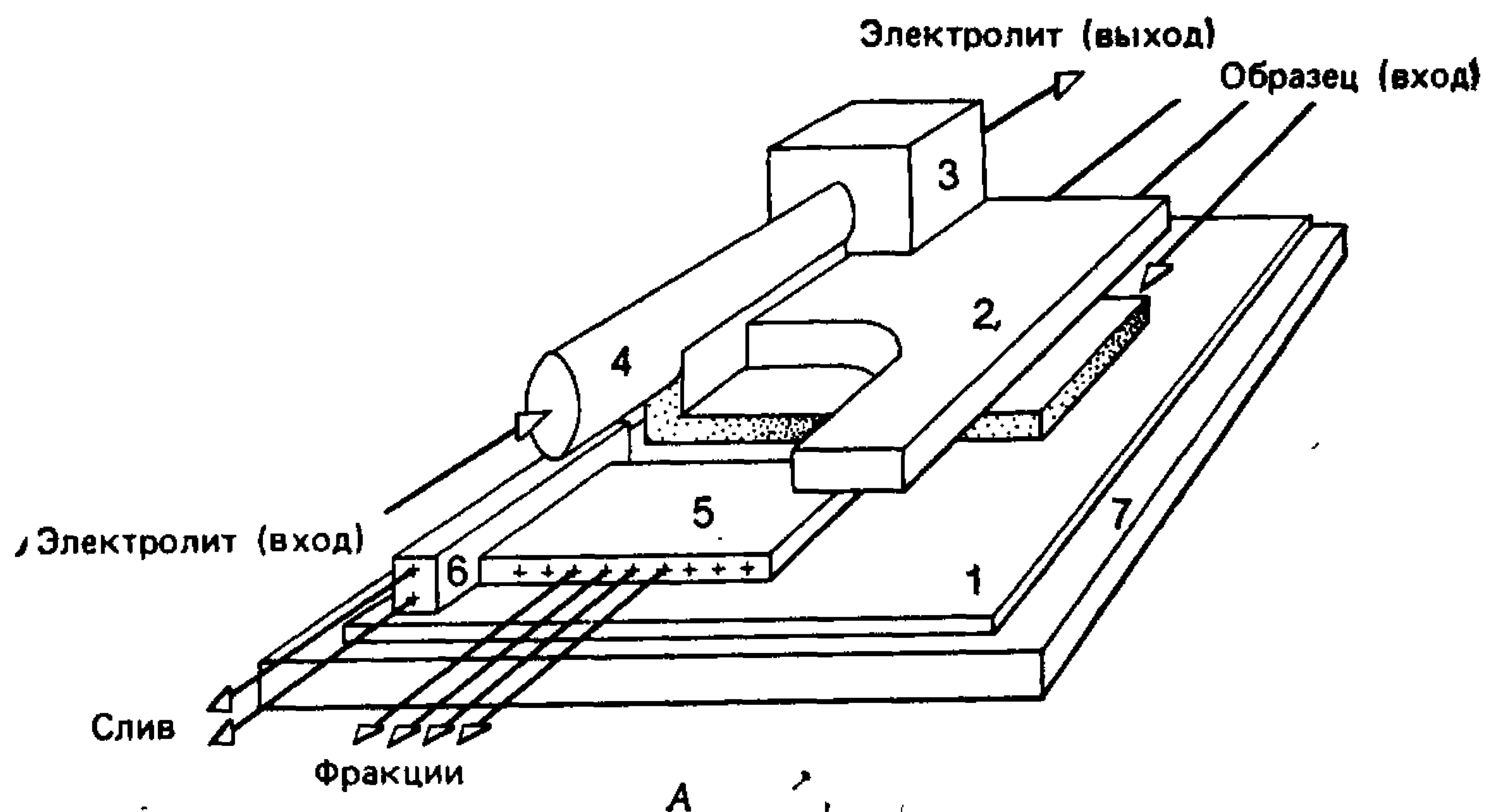
расстоянии 0,3 см друг от друга. Электродные отсеки отделены от рабочего пространства камеры закрепленными по бокам полупроницаемыми мембранами. Мембраны представляют собой пористые полиэтиленовые пластинки, в порах которых заполимеризован раствор акриламида. Разделительная камера заполнена слоем сефадекса G-100 (или гранулированного полиакриламида), который снизу поддерживается мембранным фильтром. 54 выходных канала, расположенные в нижней части камеры, подсоединены к многоканальному перистальтическому насосу.

Проточное ИЭФ обладает определенными преимуществами по сравнению с фракционированием в колонках, стабилизированных градиентом плотности. Во-первых, сфокусированные зоны в проточных системах находятся под действием электрического поля вплоть до выхода из разделительной камеры. Таким образом, они меньше размываются и перемешиваются, чем при элюции из обычных градиентных колонок. Количество белка в зоне при проточном ИЭФ может быть достаточно большим, т. е. метод обладает высокой «пропускной способностью». Так, Фоусетт сообщал о разделении 500 мг белковой смеси в день. Кроме того, с помощью этой системы можно работать и в режиме «каскада», т. е. проводить сначала прикидочное разделение в широком диапазоне pH, а затем тонкое фракционирование искомых белков в более узких градиентах pH.

2.2.2. Проточная разделительная камера Квормби

Одним из последних достижений в области проточного ИЭФ является конструкция, предложенная в работе Quarmby, 1981. Пространственная схема прибора, а также разрезы в нескольких плоскостях изображены на рис. 2.22, *А* и *Б*. Рабочий раствор прокачивается через разделительную камеру шириной 15 см, длиной 20 см и толщиной всего лишь 2 мм. При этом для отвода тепла, как и в аналитических системах (см. гл. 3), достаточно охлаждать только нижнюю поверхность камеры. Разделение проводят, как правило, при положении заполненной сефадексом G-75M камеры под углом 45° к плоскости. По-видимому, наиболее интересной особенностью этой конструкции следует считать систему сбора фракций. Она представляет собой цепочку из 188 выходных каналов, которые образованы сквозными отверстиями (диаметром 0,4 мм), проделанными в блоке из силиконовой резины (расстояние между центрами соседних отверстий 0,8 мм). Эта система позволяет собирать очень узкие фракции и тем самым гарантирует высокое разрешение при элюции сфокусированных зон.

В табл. 2.3 сравниваются различные системы проточного ИЭФ в плоском слое, в которых фракционирование проводится



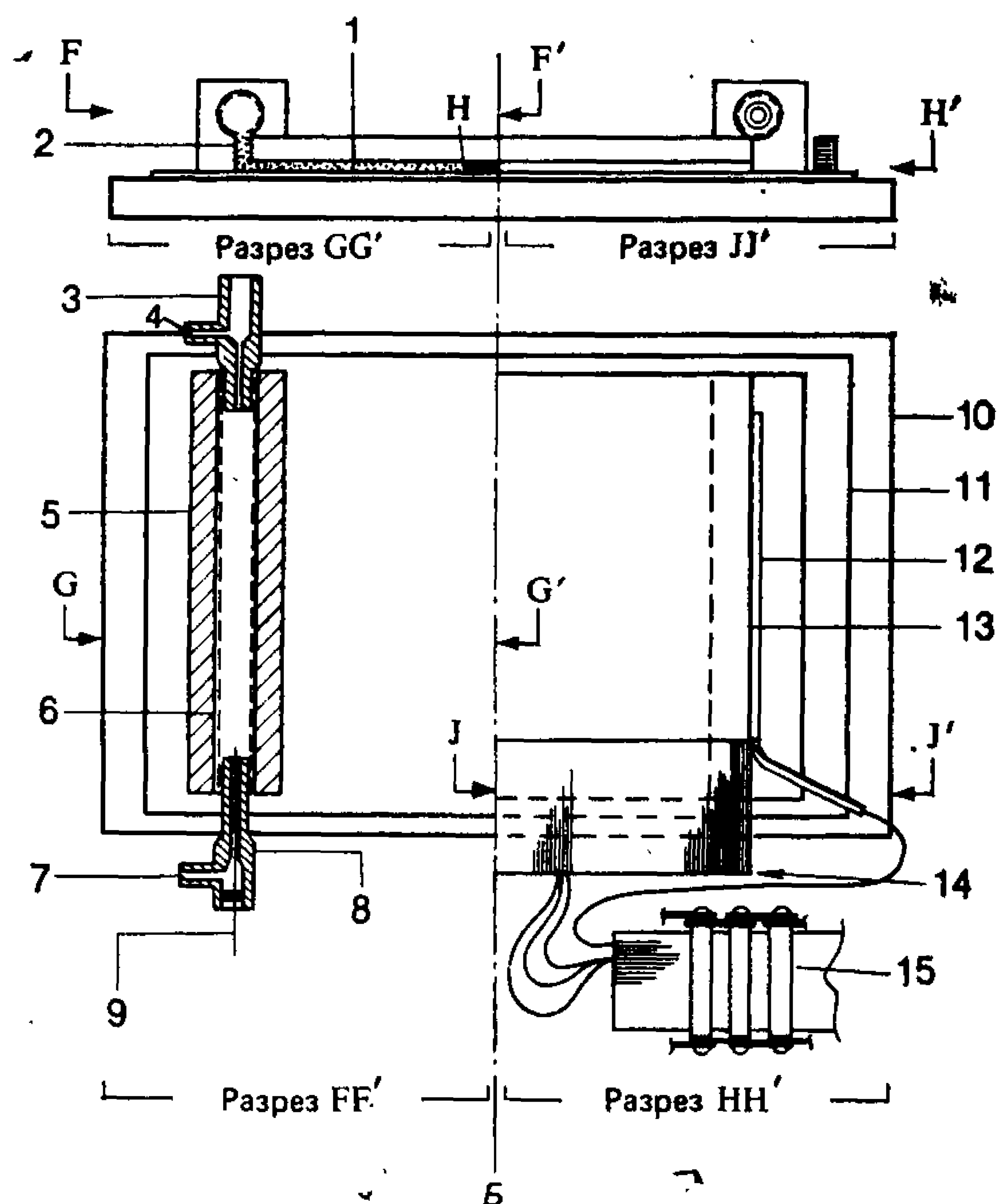


Рис. 2.22. *А*. Общий вид и устройство камеры для проточного ИЭФ в гранулированном геле. 1 — подложка из тонкого стекла, 2 — верхняя пластина из толстого стекла, 3 — электродный блок, 4 — диализная трубка, 5 — сбор фракций, 6 — слив, 7 — блок охлаждения. Затемненная поверхность указывает расположение слоя гранулированного геля. *Б*. Четыре разреза камеры. 1 — слой геля, 2 — желобок, 3 — отвод газа, 4 — электролит (выход), 5 — электродный блок, 6 — диализная трубка, 7 — электролит (вход), 8 — штеккер, 9 — электрод, 10 — блок охлаждения, 11 — стеклянная подложка, 12 — желобок, 13 — верхняя стеклянная пластина, 14 — сбор фракций, 15 — перистальтический насос. (Quarmby, 1981.)

Таблица 2.3. Сравнение технологических параметров проточных систем изоэлектрофокусирования и электрофореза в плоском слое (Quarmby, 1981)

Тип системы	Размеры разделительной камеры, мм			Устройство системы сбора фракций		Объекты фракционирования	Литература
	толщина	длина	ширина	общее число выходов	число выходов на 1 мм ширины камеры		
Циклическое ИЭФ	20	200	20	10	0,5	Белки	Egen et al., 1979
Разделение в вертикальном свободном потоке							Bier et al., 1980
	0,5	360	110	48	0,44	»	Seiler et al., 1970
	0,7	510	120	92	0,77	Эритроциты	Just et al., 1972, 1977
							Hannig et al., 1975, 1978
Разделение в горизонтальном свободном потоке	0,5	440	500	48	0,1	Панкреатическая амилаза	Prusik, 1974
						Аминокислоты	Prusik, 1975
	0,4	320	210	118	0,56	Неорганические вещества	Wagner et al., 1978
«Капиллярная» стабилизация	3	300	230	54	0,23	Белки	Fawcett, 1973
	9,5	250	200	36	0,18	Гемоглобин, альбумин	Hendeskog, 1975
	6	225	140	12	0,09	Синтетические амфолиты	Gianazza et al., 1975
	2	200	150	188	1,25		Quarmby, 1981

в свободном потоке или с использованием «капиллярной» стабилизации (т. е. стабилизации, основанной на использовании гранулированных гелей).

2.2.3. ИЭФ в гранулированных гелях (не проточное)

В работах Radola, 1973 a, b и 1975, описан весьма эффективный метод крупномасштабного препаративного ИЭФ в слое гранулированного геля. Для приготовления слоя используют суспензии таких гелей, как сефадекс G-75 (7,5 г/100 мл) или сефадекс G-200 (4 г/100 мл); оба — категории «суперфайн», а также биогель Р-60 с зернением мельче 400 меш (4 г/100 мл). Слой формируют на стеклянной или кварцевой пластине, которую можно поместить на дно формы из оргстекла (рис. 2.23). Обычно размеры пластины 40×20 см (или 20×20 см), а толщина слоя — до 10 мм. Полный объем геля может составлять от 300 до 800 мл. Для образования слоя «кашицу» (slurry) сефадекса, содержащую 1%-ные амфолины, выливают на пластину и высушивают на воздухе до достижения рабочей консистенции. Приготовление слоя четко определенной консистенции решающим образом сказывается на результатах последующего ИЭФ. По-видимому, наилучшие результаты можно получить в слое, который образуется после испарения около 25% воды и при наклоне пластины до 45° остается неподвижным. При ИЭФ пластину помещают на поверхность специального блока, охлаждаемую до 2—10 °С. Электрическое поле прикладывается с помощью платиновых электродных полосок, которые контактируют с гелем через прокладки из толстой фильтровальной бумаги, смоченные 1 М серной кислотой (на аноде) и 2 М этилендиамином (на катоде). В наиболее крупномасштабных опытах напряженность поля возрастала от 10—15 В/см (в начале) до 20—40 В/см (в конце ИЭФ). При толщине слоя 1 см удается рассеи-

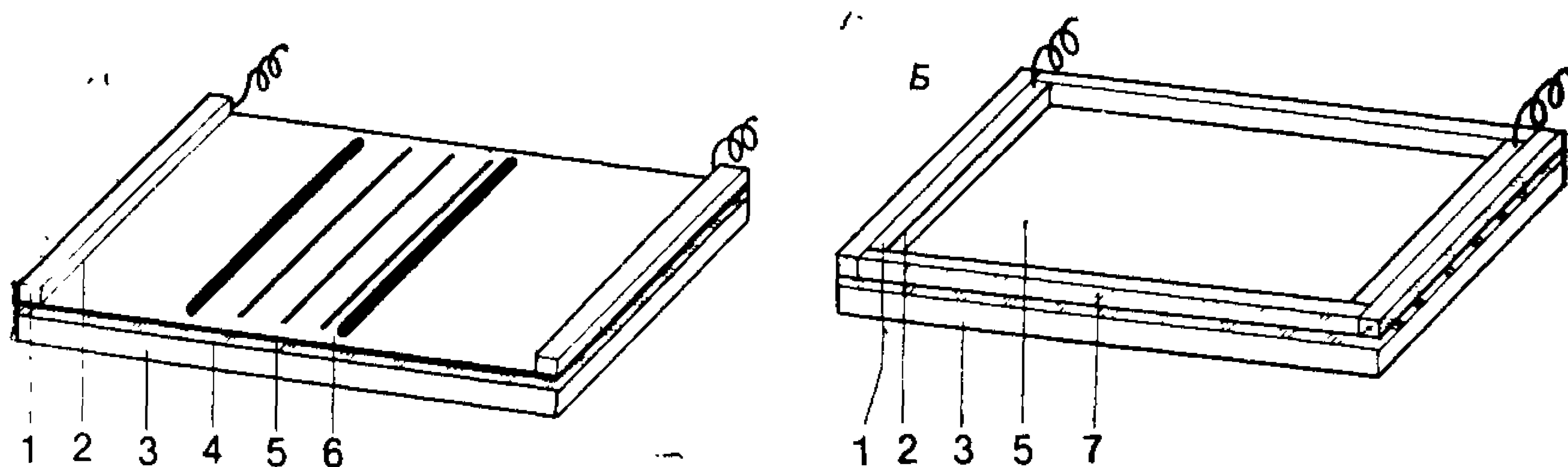


Рис. 2.23. Препаративное ИЭФ в гранулированном геле. *А*. Полупрепаративное фракционирование. *Б*. Крупномасштабное фракционирование. 1 — электрод, 2 — полоска толстой фильтровальной бумаги, смоченная электродным раствором, 3 — охлаждаемый столик, 4 — стеклянная пластина, 5 — слой геля, 6 — сфокусированные белки, 7 — рамка (Radola, 1975.)

вать тепло, выделяющееся при мощности тока до 0,05 Вт/см^3. Образцы можно предварительно смешивать с суспензией геля или наносить на поверхность готового слоя. Большие объемы образца следует смешивать непосредственно с сухим сефадексом (около 60 мг сефадекса G-200 на 1 мл жидкости) и заливать в углубление, сделанное в слое геля. Образцы можно наносить на любом участке рабочего пространства геля. Для предотвращения пересыхания поверхности в процессе ИЭФ целесообразно закрывать ее крышкой. Прибор подходящей конструкции, так называемая «двойная камера», выпускается в настоящее время фирмой Desaga, Heidelberg, ФРГ.

Для локализации белков после фокусирования применяют метод бумажной реплики (Radola, 1973 а). При снятии реплики небольшое количество всех сфокусированных белков переходит с поверхности геля на полоску фильтровальной бумаги, которую затем просушивают при 110°С. После вымывания амфолитов раствором кислоты белковые зоны на реплике можно обнаружить с помощью низкочувствительных красителей типа «светло-зеленый SF» или «кумасси фиолетовый R-150».

При использовании кварцевой подложки белки можно обнаруживать прямо в геле по пропусканию света при 270—280 нм. Для измерения градиента pH в геле используют комбинированный микроэлектрод, скользящий по калиброванному шаблону. Преимущества метода Радолы заключаются в сочетании высокой разрешающей способности, высокой допустимой загрузки образцом и простоты извлечения сфокусированных компонентов. В широком градиенте pH можно фракционировать до 5—10 мг белка на 1 мл суспензии. Сообщалось о разделении 10 г проназы Е в 800 мл суспензии геля, которое, несмотря на очень высокую загрузку, сопровождалось хорошим разрешением компонентов. При таком высоком содержании белка даже неокрашенные сфокусированные компоненты легко обнаружить в слое геля визуально; они имеют вид полупрозрачных зон. При элюции из геля белки выходят в небольшом объеме с достаточно высокой концентрацией. Отсутствие сахарозы облегчает последующее отделение белков от амфолитов-носителей.

Поскольку на поведении макромолекул, размер которых превышает предел эксклюзии сефадекса, молекулярно-ситовые эффекты не влияют, этим методом можно беспрепятственно проводить ИЭФ очень высокомолекулярных компонентов, в том числе и таких, как вирусные частицы. Конструктивная гибкость системы позволяет использовать одну и ту же рамку для аналитического, полупрепаративного и препаративного ИЭФ, варьируя только толщину слоя. Если нет возможности тестировать биологическую активность разделяемых компонентов методом бумажных реплик, то, как правило, приходится разделять гель

на сегменты, элюировать содержимое всех сегментов и определять активность в элюатах. Это достаточно трудоемкая процедура. Другой подход к ИЭФ в гранулированных гелях, позволяющий проводить полуавтоматический сбор фракций, был предложен в работе Fawcett, 1975 а. Вместо плоского слоя автор использовал вертикальную стеклянную колонку, аналогичную той, которая была описана Brakke et al., 1968, заполненную суспензией гранулированного геля. После ИЭФ из колонки удаляют слой верхнего электролита и с помощью тяжелого раствора сахарозы суспензию сефадекса вытесняют через верх колонки и подают на специальный коллектор фракций. Коллектор автоматически отбирает аликвоту суспензии геля и элюирует ее содержимое через фильтр в очередную пробирку. Таким способом удавалось получать фракции, соответствующие участку столба геля высотой всего 3 мм без значительного искажения сфокусированных зон.

Как уже отмечалось, метод, предложенный Радолой, замечателен по своей простоте, гибкости, высокой разрешающей способности и допустимой загрузке препаратом. Однако, несмотря на то что метод был впервые описан еще в 1969 г., он не получил широкого признания у экспериментаторов. Главный его недостаток заключался в нестабильности градиента pH и часто наблюдавшемся искажении сфокусированных зон. Считалось, что это может быть связано с наличием свободных карбоксильных групп на матрице сефадекса, которые было предложено блокировать обработкой окисью пропилена (Radola, 1973 а). Проблема нестабильности градиента была тщательно изучена в работах Winters et al., 1975, и Winters, 1977, благодаря которым удалось устранить бо́льшую часть недостатков метода. Авторы, в частности, выделили три основных момента в методике приготовления слоя: (1) сефадекс должен быть предварительно хорошо отмыт; (2) следует использовать сефадексы категории «суперфайн», при этом для получения бумажных реплик лучше работать с сефадексом G-75; (3) необходимо тщательно контролировать содержание воды в готовом слое. В пересушенном слое геля часто образуются микротрещины, а в слишком влажном слое белки имеют тенденцию оседать в нижнем слое геля. Предварительное промывание сефадекса имеет очень большое значение, поскольку препараты сефадексов, как правило, содержат большое количество низкомолекулярных заряженных примесей, которые мешают образованию градиента pH. Бо́льшую часть этих примесей удается удалить, промывая набухший сефадекс дистиллированной водой на воронке Бюхнера. Затем воду из геля вытесняют этанолом и сушат гель под вакуумом. В настоящее время очищенный сефадекс поставляется фирмой LKB под маркой Ultrodex. В работе Winters et al., 1975, была опи-

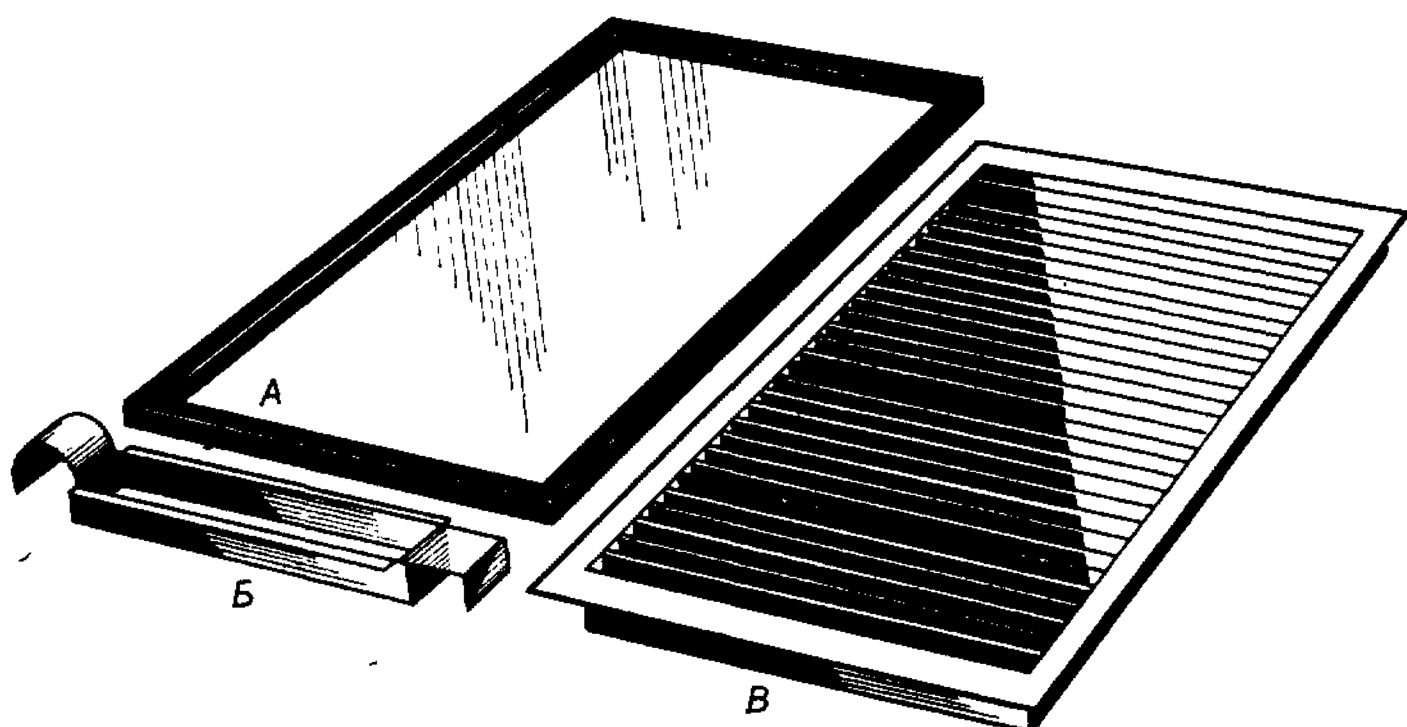


Рис. 2.24. Рамка (*А*), устройство для нанесения образца (*Б*) и «фракционирующая решетка» (*В*) для препаративного ИЭФ в гранулированных гелях с использованием аппарата Multiphor (LKB 2117). После ИЭФ опускают решетку на рамку и тем самым разделяют слой геля на 30 фракций. Фракции извлекают из желобков с помощью шпателя. (Winters et al., 1975; с любезного разрешения LKB Produkter AB.)

сана конструкция рамки для препаративного ИЭФ в слое сефадекса, которая подходит к многоцелевому аппарату Multiphor 2117 производства фирмы LKB (разд. 3.2.14). Такая рамка (см. рис. 2.24), снабженная устройством для внесения образца и «фракционирующей решеткой» из нержавеющей стали, предназначенной для разделения слоя на 30 сегментов, поставляется LKB Produkter AB. Располагая аналогичными приспособлениями, имеющуюся в вашем распоряжении аппаратуру можно использовать одновременно и для аналитического, и для препаративного фракционирования. В системе, отработанной Winters et al., 1975, применяется слой геля толщиной не более 5 мм, с тем чтобы нижняя и верхняя его части охлаждались примерно одинаково и не происходило искажения зон. Максимальная загрузка слоя может составлять от 200 до 400 мг белка в зависимости от гетерогенности исходной смеси. Свежеприготовленную кашицу геля (около 5 г сухого материала на 200 мл 2%-ного раствора амфолинов) выливают на лоток, не дожидаясь полного набухания геля. Испарение воды ускоряется с помощью небольшого настольного вентилятора, закрепленного в 1 м над лотком, и продолжается в течение 2—3 ч до того, как испарится 20—50% всей воды, содержащейся в суспензии. Затем лоток с гелем переносят на охлаждающий столик аппарата Multiphor, с помощью соответствующего приспособления наносят образец и ведут ИЭФ в течение 10 ч при 10°С и мощности 10 Вт, контролируемой источником питания со стабилизацией по мощности. Электроды, как правило, устанавливают по коротким сторонам слоя таким

образом, что разделение белков происходит в длину (расстояние между электродами 25 см). С помощью «фракционирующей решетки» (рис. 2.24) разделяют гель на 30 сегментов, которые вынимают из желобков при помощи шпателя. Для извлечения белка из геля последний помещают в цилиндр шприца, дно которого закрыто стекловатой, добавляют сверху порцию элюента и прокачивают элюент через гель с помощью обычного поршня (Winters et al., 1975).

Совершенствование техники препаративного ИЭФ в слое гранулированного геля побудило других авторов к разработке простого и эффективного сканирующего устройства для прямой регистрации сфокусированных зон (Holmquist, Broström, 1979). Сканирующее устройство встроено в латунную коробку, закрепленную на спектрофотометре (модель Beckman DU). Световой пучок от монохроматора отражается зеркалом и направляется через кварцевую пластинку, которая служит подложкой для геля. С помощью этого устройства можно легко локализовать белковые зоны в слое геля. Такой метод детектирования является весьма быстродействующим; он позволяет следить за тем, происходит ли искажение зон в процессе ИЭФ. Кроме того, в отличие от метода бумажных реплик сканирование не сопровождается частичной потерей материала.

Метод Радолы нашел еще одно важное применение — для электрофоретической десорбции белков, прочно связанных с аффинными сорбентами (Haff et al., 1979; Lasky, Manrique, 1980). После предварительного фокусирования амфолитов в слое гранулированного геля ближе к краю пластины делают узкую канавку, в которую загружают порцию аффинного сорбента, несущего искомое вещество. Десорбция протекает быстрее при максимальном увеличении суммарного заряда десорбируемого вещества, поэтому зону аффинного сорбента помещают на максимальном удалении от области фокусирования десорбируемого белка. После десорбции и фокусирования зоны искомых белков регистрируют, белки извлекают из геля и отделяют от амфолитов гель-фильтрацией.

Возможны некоторые варианты применения метода: расщепление комплексов между антителами и иммобилизованными антигенами (и наоборот), десорбция белков с гидрофобных сорбентов и извлечение белков из агарозных и полиакриламидных гелей.

В работах O'Brien et al., 1976, и Johnson et al., 1976, описана еще одна модификация метода Радолы. Авторы проводили ИЭФ в колонке, заполненной сефадексом G-15, с обоих концов закрытой пробками из полиакриламида. Для облегчения процедуры удаления пробок ПААГ был заполимеризован в нейлоновых сетках. После ИЭФ и удаления пробок в нижнюю часть колонки

помещали плунжер и элюировали сфокусированные зоны раствором, содержащим амфолиты и глицерин, или просто дистиллированной водой. При загрузке до 300 мг белка на зону авторам удавалось получать разделяемые компоненты с выходом около 96%. В работах Otavsky et al., 1977, и Harper, Kuepers, 1980, были исследованы возможности применения других, отличных от сефадекса или гранулированного полиакриламида незаряженных матриц для создания антиконвекционной среды при ИЭФ. Обнадеживающие результаты были получены при ИЭФ в слое гранулированного инертного пластика певикон С-870 (диаметр гранул 100 мкм), который представляет собой продукт сополимеризации винилхлорида и винилацетата (см. также разд. 1.9). Этот полимер образует весьма прочный слой, из которого с высокой точностью можно вырезать необходимые сегменты. Слой хорошо удерживает жидкость. Его можно получить просто осаждением из суспензии или с помощью устройств, применяемых для изготовления тонкослойных пластинок. После ИЭФ, которое в этом случае практически не сопровождается эндосмосом, белки извлекают с помощью центрифугирования через крупнопористый фильтр. Применение певикона, по всей видимости, перспективно как для препаративного, так и для аналитического варианта фракционирования.

2.2.4. ИЭФ в многофазных колонках

Применение вертикальных колонок нового типа для многофазного ИЭФ было впервые описано в работе Stathakos, 1975. В основе метода лежит принцип, в какой-то мере аналогичный принципу действия многокамерного электролизера, который был рассмотрен в работе Rilbe et al., 1975. Колонка монтируется из блоков, в которых находятся отдельные цилиндрические сегменты геля, заключенные между промежуточными слоями жидкости. В верхнем и в нижнем концах колонки расположены электродные отсеки. Число монтируемых блоков может быть больше или меньше в зависимости от конкретной задачи. Схематическое изображение колонки, составленной из шести одинаковых разделительных отсеков, приведено на рис. 2.25. Колонки этого типа обладают богатыми и разнообразными экспериментальными возможностями. Образцы можно вносить практически в любой участок колонки — в верхнюю часть, в любой промежуточный слой жидкости (высотой 2,5 мм) между соседними блоками или во внутреннее пространство одного или нескольких блоков. В любой момент времени можно проконтролировать pH в любом промежуточном слое жидкости. Пространство между соседними блоками, внутри которого заключена жидкость, образует как бы отдельную камеру со своим входом и выходом. Для

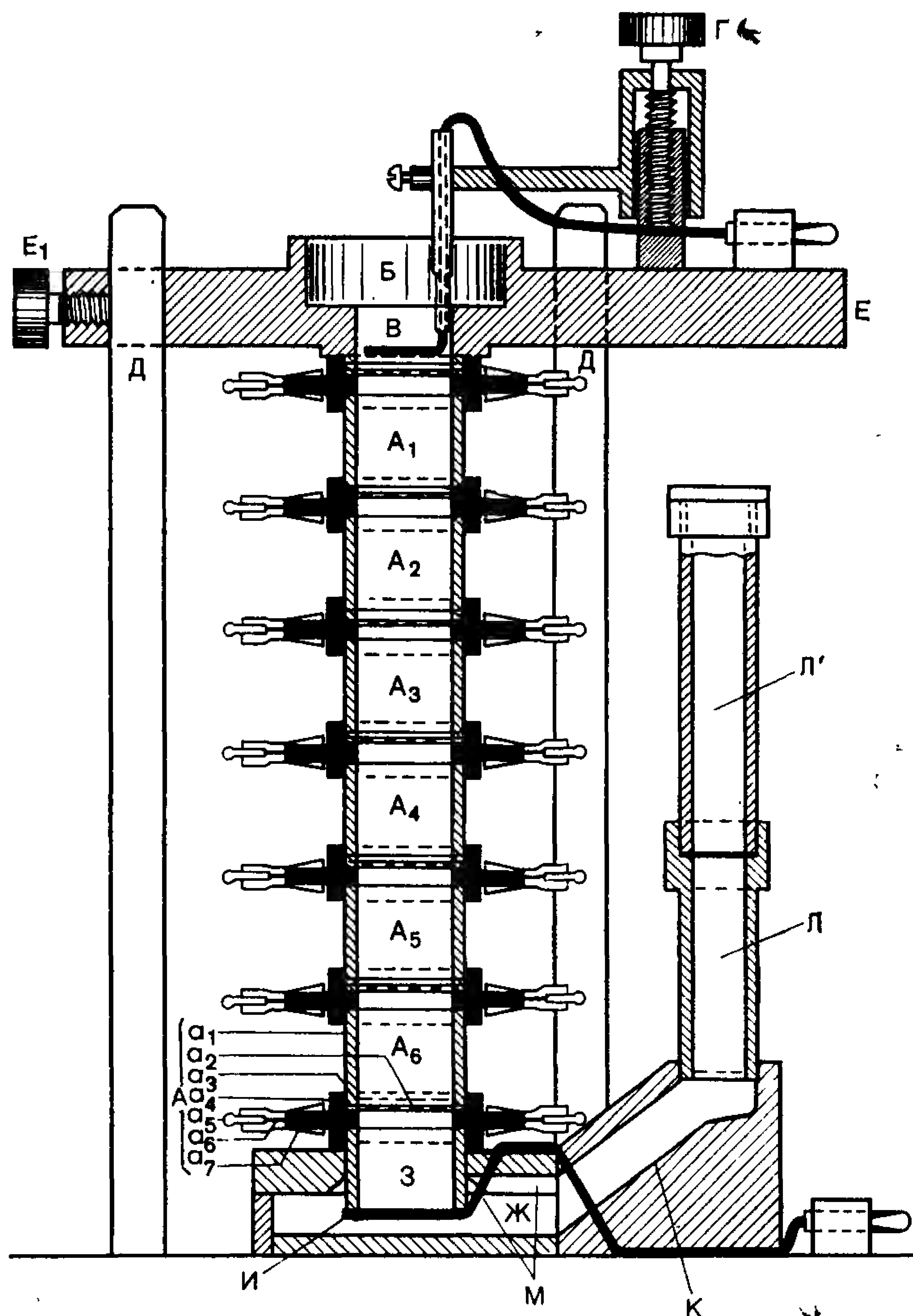


Рис. 2.25. Вертикальное сечение установки для ИЭФ в многофазной колонке, состоящей из шести последовательно смонтированных блоков. $А_1$—$А_6$ — 6 отдельных сегментов геля, расположенных в соответствующих блоках. Устройство каждого блока: $а_1$ — трубчатый корпус, $а_2$ — поддерживающая мембрана, $а_3$ — кольцевая прокладка из силиконовой резины, $а_4$ — крепежное кольцо, $а_5$ — стеклянная пробка, $а_6$ — пластиковый кожух, $а_7$ — выходной отросток. Б — верхняя электродная камера, В — верхний электрод, Г — винт-регулятор подъема электрода, Д — металлические опорные стержни, Е — верхняя панель, $Е_1$ — винт крепления панели, Ж — нижняя электродная камера, З — цилиндрическое основание колонки, И — нижний электрод, К — наклонный канал, ведущий к вспомогательной уравновешивающей трубке Л, Л' — дополнительная насадка, М — канал для отвода электролизных газов. (Stathakos, 1975.)

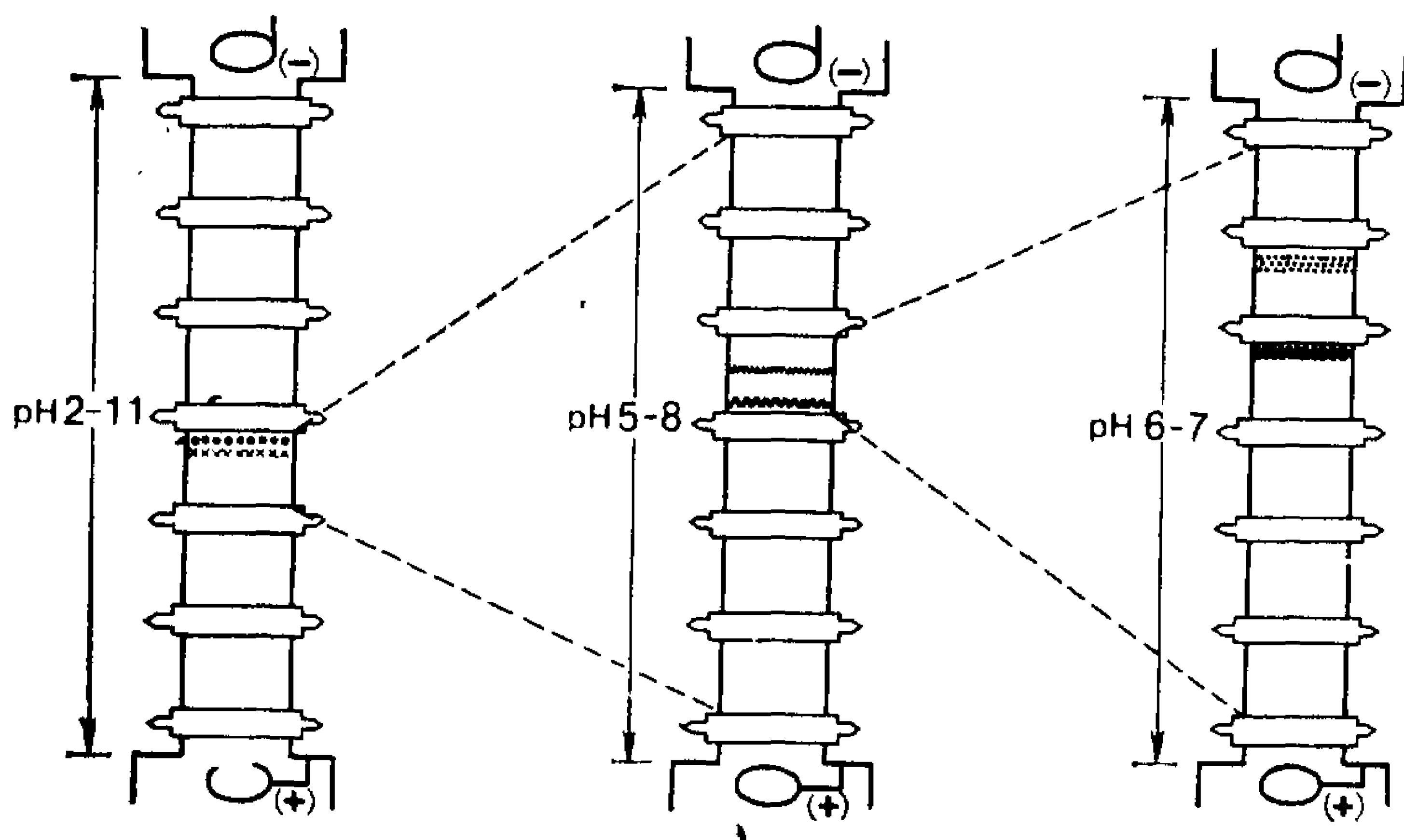


Рис. 2.26. Выделение гипотетического белка с pI=6,7 по методу «каскадного» ИЭФ с переходом от крутого к более пологим градиентам pH. (Stathakos, 1980.)

определения pH можно просто отобрать несколько микролитров жидкости из такой камеры или же выкачать все ее содержимое, измерить pH и закачать обратно. Поскольку пористость геля в каждом блоке можно варьировать независимо, дополнительной очистки искомых белков можно добиться, подбирая пористость в сегментах, находящихся на пути разделения, так, чтобы избирательно задерживать те или иные компоненты смеси. Белки, сфокусированные в одном из сегментов, можно подвергнуть дальнейшему фракционированию в более пологом градиенте pH. Для этого достаточно извлечь соответствующий блок и вмонтировать его в другую колонку. Эту операцию можно повторить несколько раз, т. е. вести разделение по принципу «взрыва» или «каскада» до тех пор, пока не будет достигнуто состояние «один гель—один белок» (рис. 2.26; Stathakos et al., 1980). В конце концов очищенный белок можно извлечь из геля с помощью электроэлюции с одновременной очисткой от амфолинов так, как описано в работе Suzuki et al., 1973 (см. разд. 4.6).

2.2.5. ИЭФ в цилиндрических полиакриламидных гелях

Имея в виду хорошую разрешающую способность и высокую допустимую загрузку при ИЭФ в цилиндрических полиакриламидных гелях, мы приспособили обычный прибор для аналитического ИЭФ в трубках для препаративного фракционирования (Righetti, Drysdale, 1973). Для этого оказалось достаточно заменить центральный блок прибора на аналогичный блок, рассчи-

танный на трубки большего размера. Трубки закрепляются в соответствующих гнездах с резиновыми прокладками, между двух параллельных дисков, образующих герметичный центральный отсек. В этом отсеке циркулирует охлаждающая жидкость с температурой 1°С. Кольцевые платиновые электроды расположены в верхнем и нижнем отсеках, близко к концам трубок, для сведе́ния к минимуму выхода амфолитов из геля и подавления катодного дрейфа градиента рН. В препаративном варианте прибор содержит 6 трубок с гелем — 3 трубки объемом по 50 мл (диаметр 2 см), 2 — по 20 мл (диаметр 1,2 см) и одну контрольную трубку объемом 2 мл при внутреннем диаметре 2 мм. Трубки (стеклянные или пластиковые) имеют длину 16 см. Для устранения молекулярно-ситовых эффектов используют гели с очень крупными порами — $T=4\%$, $C=4\%$ (определение величин T и C, предложенных Hjertén, 1962, дано в разд. 3.2.8).

Заполимеризованные гели перед использованием выдерживают при 4°С. Максимальная загрузка для самых широких трубок составляет около 200 мг белка. Образцы можно наносить на верхний торец геля или же включать в состав исходного раствора мономеров до полимеризации геля.

По разрешающей способности такая препаративная система сопоставима с аналитической. Как и в других гелевых средах, концентрация белка в зоне может быть настолько высока, что даже неокрашенные сфокусированные белки часто хорошо различимы невооруженным глазом: они имеют вид матовых дисков. Методология ИЭФ в трубках с ПААГ детально рассмотрена для аналитического варианта в разд. 3.2.7 и практически полностью применима к препаративному варианту фракционирования. Однако необходимо учитывать, что при переходе к более толстым гелям эффективность теплоотвода снижается, поэтому электрическую мощность не следует увеличивать прямо пропорционально объему геля.

Упомянутый выше прибор для ИЭФ в трубках (аналитический вариант изображен на рис. 3.21) выпускается фирмой MRA, Boston, MA (USA). Основные проблемы препаративного фракционирования в полиакриламидном геле связаны с обнаружением и извлечением белков после ИЭФ. Разрезание геля на сегменты с последующей элюцией буфером часто сопровождается низким выходом и значительным разбавлением образцов. В работе Suzuki et al., 1973, был описан другой весьма остроумный метод извлечения белков из геля. Стандартную (пустую) трубку закрывают снизу диализной мембраной и наливают в нее немного «тяжелого» буферного раствора. Поверх этого раствора полимеризуют «пробку» — короткий столбик полиакриламидного геля. Один из сегментов, вырезанных после ИЭФ в геле, измельчают и переносят на поверхность «пробки» в виде

суспензии в тяжелом буферном растворе. После этого трубку доверху заполняют буфером и проводят электрофоретическую элюцию образца с помощью того же самого прибора. Элюируемые компоненты удается получать с хорошим выходом в виде концентрированных растворов, практически свободных от амфолитов, которые беспрепятственно проходят через мембрану. Аналогичная система электроэлюции была описана также в работе Chrambach et al., 1973.

2.2.6. *ИЭФ в пластинах полиакриламидного и агарозного гелей*

Для препаративного ИЭФ в плоском слое помимо гранулированных гелей типа сефадекса можно использовать и сплошные пластины полиакриламидного или агарозного гелей. Этот подход имеет определенные преимущества по сравнению с ИЭФ в толстых трубках главным образом благодаря тому, что при ИЭФ в пластинах геля возможен значительно более эффективный отвод тепла. При фокусировании в пластине ПААГ было также отмечено несколько более высокое разрешение, чем в слое сефадекса (Gaesslin, Weise, 1974). Для аналитического и препаративного ИЭФ в пластинах геля может использоваться одна и та же аппаратура. Толщина слоя геля может быть увеличена просто за счет использования более широких прокладок («спейсеров») при полимеризации. Образцы можно наносить на горизонтальную поверхность геля либо непосредственно в виде полоски раствора, либо с помощью кусочков толстой фильтровальной бумаги, смоченных в растворе образца. Для внесения образца (в растворе или на бумаге) можно использовать также специально вырезанные в геле лунки или желобки. Разрешающая способность препаративного варианта сопоставима с разрешающей способностью ИЭФ в тонких аналитических гелях. При использовании кварцевой подложки сфокусированные белковые зоны можно регистрировать прямо в геле УФ-сканированием с помощью спектрофотометра (фирмы Zeiss). Положение белковых зон можно также определить, быстро окрашивая полоски геля, отрезанные с двух концов пластины (параллельно направлению миграции; см. рис. 2.27). Белки извлекают из геля с помощью обычной или электрофоретической элюции (разд. 4.6). Многие исследователи склонны сомневаться в эффективности обычной элюции белков из ПААГ. Тем не менее, как описано в работе Graesslin, Weise, 1974, с помощью обычного встряхивания сегментов геля в элюирующем буфере авторам удавалось извлекать белки с общим выходом 74%.

Препаративное ИЭФ в агарозе стало возможным (Chapius-Cellier, Arnaud, 1981) только после того, как в продажу начала

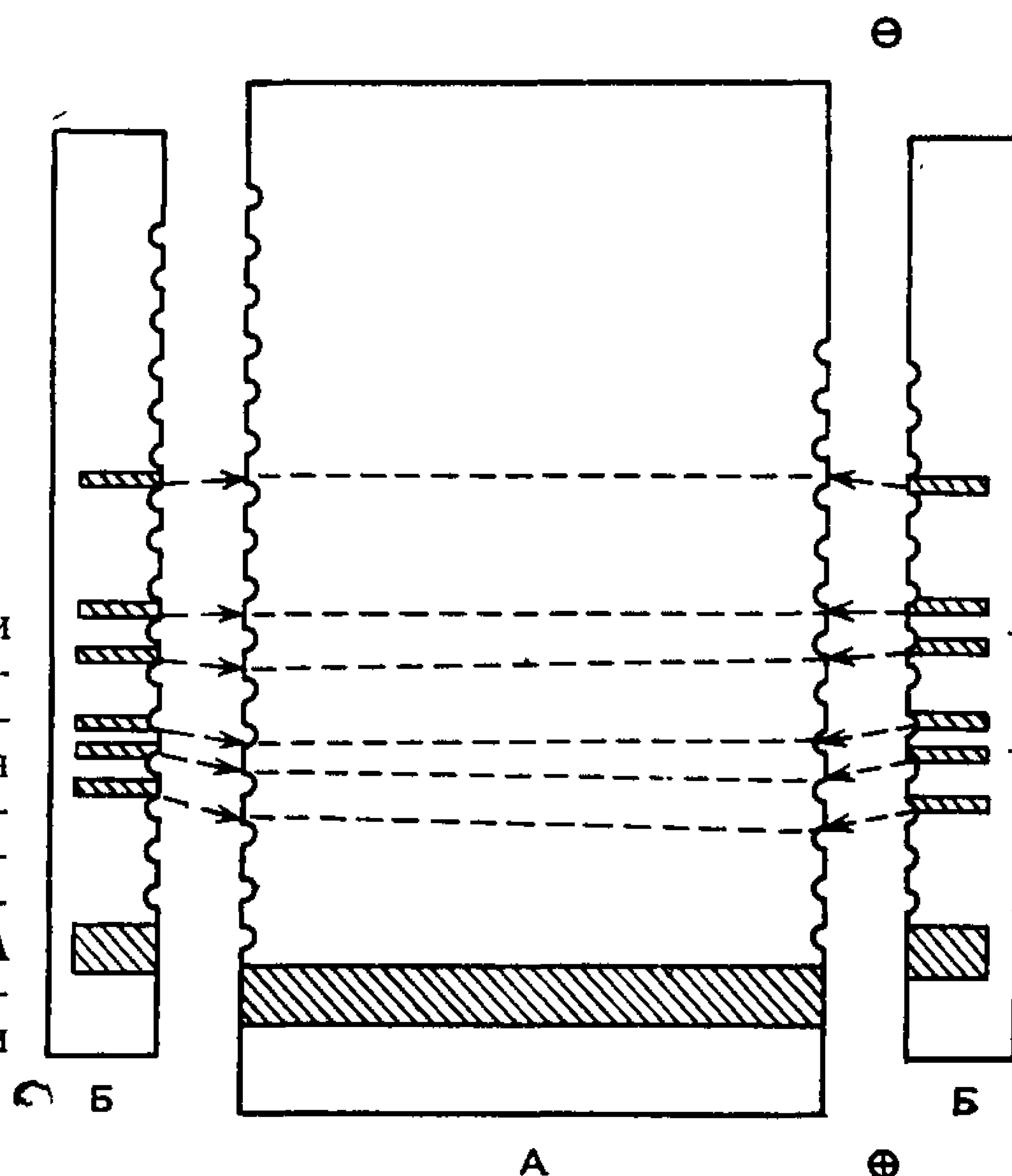


Рис. 2.27. Способ локализации белковых зон при препаративном ИЭФ в тонком слое. А — неокрашенная центральная часть пластины геля, Б и Б′ — боковые полоски геля, окрашенные СВВ. Положение сфокусированных зон в пластине А устанавливают с помощью зубчатых разрезов между А, Б и Б′. (Graesslin, Weise, 1974.)

поступать специально очищенная агароза, практически не содержащая заряженных групп (например, Isogel фирмы Marine Colloids, Rockland, Maine). Гель готовят на основе 0,8%-ного раствора агарозы, содержащего 2% амфолитов-носителей. В качестве электродных растворов следует использовать слабые растворы электролитов, например 0,1 М NaOH и 0,1 М уксусную кислоту. В пластине размером 84×30×2 мм при мощности 15 Вт фокусирование продолжается 8 ч (начальные условия: 500 В и 30 мА; конечные — 1500 В и 10 мА). Пластину геля разделяют на 30 сегментов с помощью фракционирующей решетки, изображенной на рис. 2.24; сегменты измельчают и трижды экстрагируют подходящим буфером. Авторы сообщали о фракционировании до 1 г сывороточных белков с выходами от 68 до 82%.

2.2.7. Хроматофокусирование и амфолит-вытеснительная хроматография

Хроматофокусирование впервые было описано в работах Sluyterman, Wijdenes, 1977, 1978, 1981 a, b, и Sluyterman, Elgerson, 1978. Было показано, что при хроматографии на ионообменнике в градиенте pH белки фокусируются и выходят с колонки при значениях pH элюента, близких к их pI. Таким образом, хроматофокусирование должно сочетать высокую разрешающую способность, обусловленную фракционированием по различию в

значениях pI, с хорошими препаративными возможностями, характерными для ионообменной хроматографии. Хроматографические пики при хроматофокусировании выходят в узких интервалах pH, в пределах 0,04—0,05 ед. pH. За один опыт можно проводить фракционирование образцов, содержащих несколько сот миллиграммов белка. Рассчитано (Sluyterman, Wijdenes, 1981), что интервал pH выхода белковой зоны («ширина» зоны) при хроматофокусировании выражается соотношением

$$\Delta \mathrm{pH} \approx \pm \sqrt{\frac{\mathrm{dpH}}{\mathrm{d}V} \Big/ \varphi \frac{\mathrm{d}Z}{\mathrm{dpH}}}, \qquad (50)$$

где ϕ определяется как

$$\varphi = F\psi RT. \qquad (51)$$

Здесь ψ — потенциал Доннана, $\mathrm{dpH}/\mathrm{d}V$ — наклон градиента pH, отнесенного к единице площади поперечного сечения, $\mathrm{d}Z/\mathrm{dpH}$ — наклон кривой титрования белка вблизи его pI. Следует обратить внимание на сходство между этим математическим выражением и уравнением (23), выведенным в работе Rilbe, 1973 a, для разрешающей способности при ИЭФ. Сходство становится очевидным, если учесть, что градиент напряженности поля E в уравнении (23) соответствует потенциалу ψ в уравнении (50), подвижность белка u соответствует заряду Z, а диффузией при хроматофокусировании фактически можно пренебречь (Sluyterman, Wijdenes, 1978).

Как же в действительности проводят хроматофокусирование? Во-первых, выбирают подходящую анионообменную колонку и

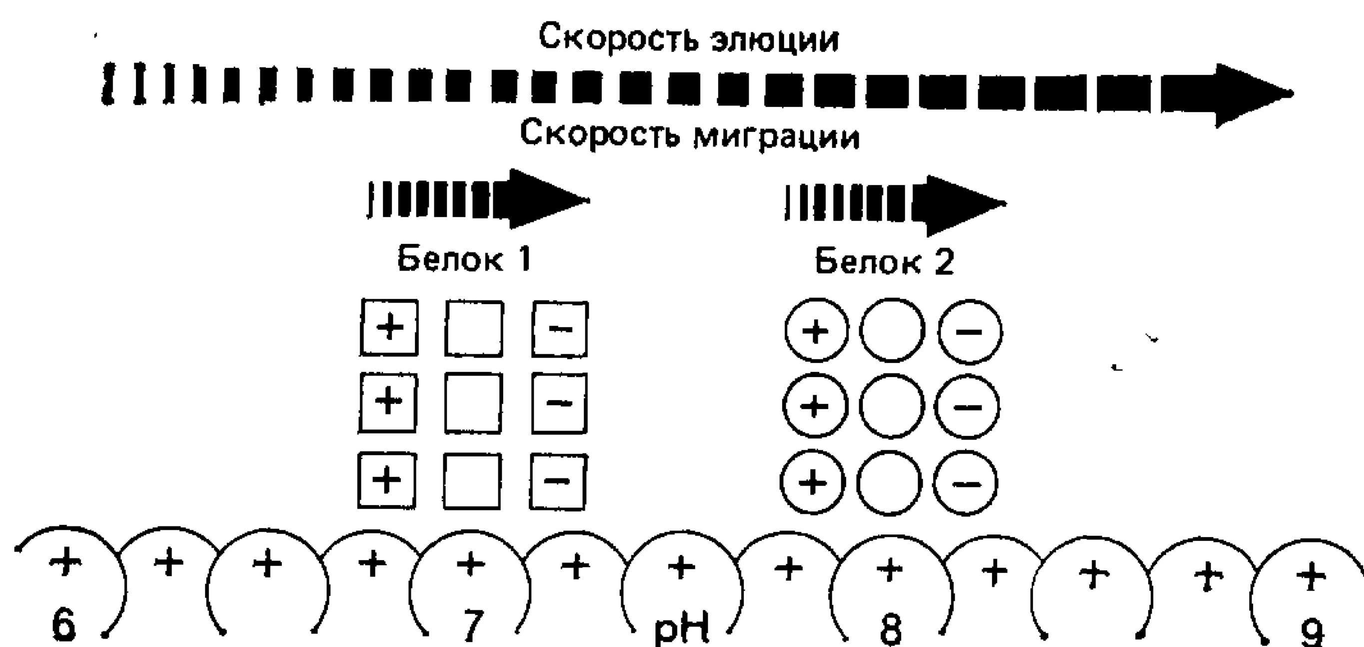


Рис. 2.28. Поведение белковых молекул при хроматофокусировании. pH возрастает при движении по колонке сверху вниз. В той области, где pH оказывается выше pI данного белка, последний приобретает отрицательный заряд и начинает связываться с обменником. При pH ниже изоточки белок «отталкивается» от положительно заряженной матрицы, а при pH=pI не «отталкивается», но и не связывается. На рисунке гипотетический белок 1 имеет pI=7, а белок 2 — pI=8. (С любезного разрешения Pharmacia Fine Chemicals.)

уравновешивают ее при самом высоком значении pH, которое будет использовано при фракционировании. Образец растворяют в буфере при самом низком рабочем значении pH, диализуют против этого «кислого» буфера и наносят на колонку. Рабочий интервал pH выбирают таким образом, чтобы значения pI разделяемых компонентов приходились примерно на середину градиента pH. Для получения хороших результатов ширина рабочего интервала pH в одном опыте не должна превышать 3 ед. pH. После нанесения образца ведут элюцию «кислым» буфером. За счет кислотно-основного обмена между буфером и ионообменником образуется градиент pH в пределах двух крайних значений pH двух рабочих буферов. Участок, на который распространяется градиент pH, постепенно продвигается вниз по колонке. В конце концов белки выходят из колонки в градиенте pH в порядке убывания значений pI.

Поведение белков при хроматофокусировании проиллюстрировано на рис. 2.28. При миграции белка вниз по колонке он поначалу находится недалеко от исходной зоны кислого буфера при pH ниже значения своего pI. При этом белок в целом заряжен положительно; он отталкивается от положительно заряженной матрицы и продвигается по колонке, практически не задерживаясь. Однако постепенно, попадая в более щелочную область градиента pH, белок перезаряжается и начинает связываться с ионообменником. Белок остается связанным с матрицей до тех пор, пока значение pH на соответствующем участке колонки, по мере продвижения градиента pH, не станет вновь ниже, чем его pI. Продвижение белка с элюентом снова продолжается до попадания в более щелочную область градиента. По-

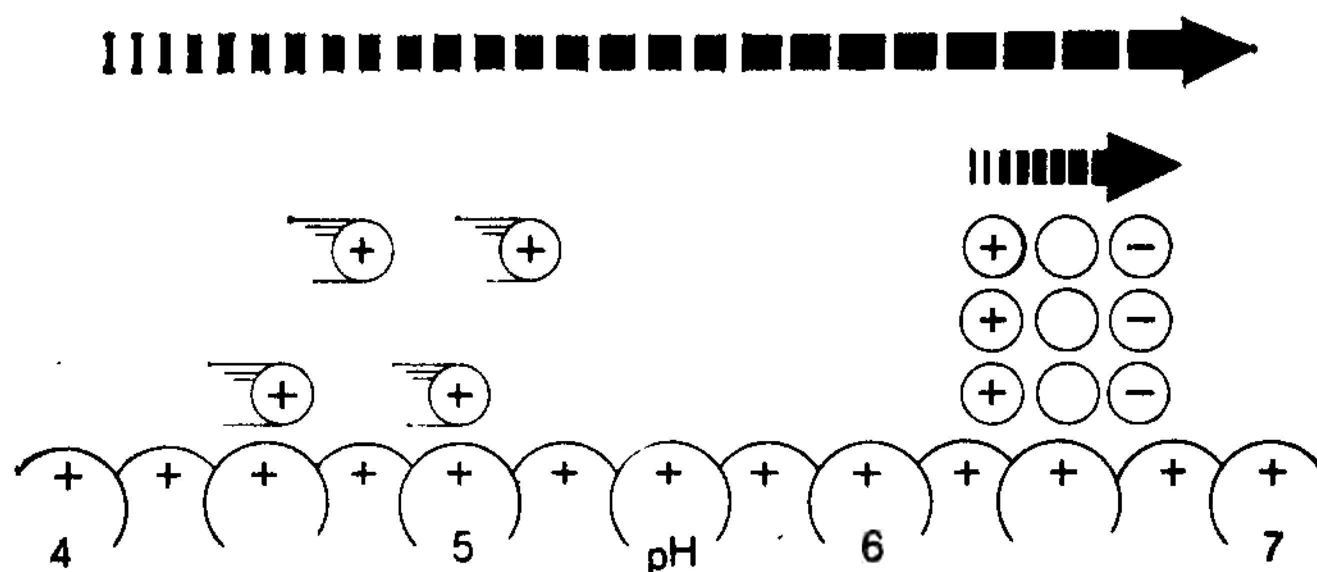


Рис. 2.29. Фокусирующий эффект при хроматофокусировании. Молекулы, находящиеся в «хвосте» белковой зоны, «отталкиваются» от обменника и мигрируют с большей скоростью, чем молекулы во фронтальной части зоны. Если на колонку нанести вторую порцию раствора того же белка, то она может догнать первую и обе они выйдут из колонки в виде общей зоны. Если дополнительно нанести порцию раствора другого белка, с более высоким значением pI, то этот белок может обогнать зону первого белка и выйти из колонки раньше его. (С любезного разрешения Pharmacia Fine Chemicals.)

переменная сорбция и десорбция белка происходят вплоть до его выхода из колонки при pH, равном pI.

Сущность фокусирующего эффекта при хроматофокусировании проиллюстрирована на рис. 2.29. После нанесения белка на колонку он мигрирует быстро вместе с элюентом до тех пор, пока не попадает в область градиента pH, соответствующую его pI. Начиная с этого момента и вплоть до выхода из колонки белковая зона мигрирует с меньшей скоростью. Если по ходу процесса на колонку нанести вторую аликвоту того же образца, то вторая белковая зона будет продвигаться с фронтом элюента, пока не догонит первую, медленно мигрирующую зону. После этого зоны сливаются и далее движутся по колонке и элюируются в виде одной общей зоны.

Для проведения хроматофокусирования в лабораторных условиях можно пользоваться буферными смесями и ионообменниками, которые предлагает фирма Pharmacia. Специальный ионообменник, называемый полибуферным обменником (Polybuffer exchanger) марки PBE 94, применяется для хроматофокусирования в сочетании с буферными смесями — полибуфером 96 (рабочий диапазон pH 9—6) и полибуфером 74 (рабочий диапазон pH 7—4). Для работы в более щелочной области используют обменник PBE 118, ав качестве элюента — фармалиты pH 8—10,5.

Что представляют собой эти буферы и обменники? Нет сомнений, что в состав полибуферов 96 и 74 входят амфолиты-носители соответствующих диапазонов pH, предназначенные для разделения белков, изоточки которых лежат внутри этих диапазонов. Ионообменники содержат функциональные группы с буферными свойствами в области pH 4—9 (PBE 94) или pH 8—11 (PBE 118). Эти группы ковалентно «пришиты» к полисахаридной матрице сефарозы 6 B. Разница между обменниками для хроматофокусирования и обычными ионообменниками заключается в том, что первые содержат одновременно несколько типов буферных групп с различными значениями p*K*. В обычных ионообменниках присутствуют буферные группы только одного типа с определенным значение p*K* (например, с p*K* 9,5 для ДЭАЭ-сефадекса или с p*K* 4,5 для КМ-сефадекса).

Для того, чтобы в колонке мог сформироваться стабильный градиент pH, необходимо, чтобы совокупность иммобилизованных на матрице функциональных групп по буферной емкости во всем рабочем диапазоне pH была сопоставима с амфолитами, которые используются для элюции. И на самом деле, обменник PBE 94 характеризуется практически постоянной хорошей буферной емкостью в диапазоне pH 4—9 (в среднем около 3—3,5 мэкв. на 100 мл геля на 1 ед. pH), а PBE 118 — еще более высокой буферной емкостью при pH 8—11 (около 4—4,5 мэкв. на

100 мл на 1 ед. рН). Не исключено, что обменник PBE 118 синтезируется по методу Sluyterman, Wijdenes, 1981 b, присоединением полиэтиленимина (ПЭИ) к сефарозе 6 В через бисоксирановый мостик. В щелочной области рН ПЭИ практически полностью депротонирован (см. также Righetti, Hjertén, 1981), поэтому слабые иминогруппы обменника модифицируют О-метилизомочевиной для получения сильно основных гуанидиновых групп. О структуре обменника PBE 94 почти ничего не известно. Обменник такого типа можно было бы получить иммобилизацией на сефарозе 6 В смеси олигоаминов типа ТЭТА, ТЭПА и ПЭГА (разд. 1.7.1).

В табл. 2.4 приведены рекомендации по выбору обменника, исходного буфера и элюирующего буфера для хроматофокусирования в различных диапазонах рН.

Недавно был описан еще один вариант хроматофокусирования, в котором для получения подвижного градиента рН использовали смесь обычных амфотерных и неамфотерных буферов (Hearn, Lyttle, 1981).

В отличие от хроматофокусирования сущность метода «амфолит-вытеснительной хроматографии» (АВХ, в оригинале — «ampholyte displacement chromatography», или ADC) далеко не так понятна. Теория метода не разработана. Тем не менее фракционирование с помощью АВХ, впервые описанное Leaback, & Robinson, 1975, было впоследствии успешно использовано и в ряде других работ (Young, Webb, 1978 a, b; Young et al., 1978; Young, Webb, 1980; Pagé, Belles-Isles, 1978; Chapius-Cellier et al.,

Таблица 2.4 Буферные растворы и обменники для хроматофокусирования в различных диапазонах рН[1]

Диапазон рН	Обменник	Исходный буфер	Элюент
9—10,5	PBE 118	25 мМ триэтиламин-HCl, рН 11	Фармалиты рН 8—10,5—HCl рН 9,0
8—9	PBE 94	25 мМ этаноламин-HCl, рН 9,4	Фармалиты рН 8—10,5 — HCl рН 8,0
7—8	PBE 94	25 мМ трис-HCl, рН 8,3	Полибуфер 96 — HCl рН 7,0
6—7	PBE 94	25 мМ имидазол-CH_3COOH, рН 7,4	Полибуфер 96 — CH_3COOH рН 6,0
5—6	PBE 94	25 мМ гистидин-HCl, рН 6,2	Полибуфер 74 — HCl рН 5,0
4—5	PBE 94	25 мМ пиперазин-HCl, рН 5,5	Полибуфер 74 — HCl рН 4,0

1 Chromatofocusing with polybuffer and PBE Pharmacia Fine Chemicals, November 1980.

1980; Emond, Pagé, 1980; Francina et al., 1981). При АВХ элюция с обычных ионообменников проводится с помощью раствора амфолитов-носителей. Однако, поскольку ионообменник уравновешен при рН, равном рН элюента, нет никаких оснований ожидать, что образуется хоть какой-то градиент рН. Механизм элюции при АВХ неизвестен, но полагают, что он основан на конкуренции между белками и амфолитами за связывание с заряженными группами матрицы. Поскольку градиент рН не образуется, белки при АВХ элюируются не всегда строго в порядке изменения их pI. В отличие от хроматофокусирования при АВХ не наблюдается никакого фокусирующего эффекта. Кроме того, для элюции приходится использовать высокие концентрации амфолитов (около 60 г/л). В то же время при хроматофокусировании элюция происходит главным образом вследствие изменения заряда белка, а не из-за «вытеснения», и поэтому концентрация амфолитов в элюенте может быть значительно ниже (порядка 10 г/л).

Помимо двух рассмотренных хроматографических методов применяется еще и так называемая «изоэлектрическая хроматография» (Petrilli et al., 1977). Этот термин был использован применительно к двухстадийной последовательной ионообменной хроматографии (на анионообменнике и катионообменнике) при рН, равном pI выделяемого компонента. Очистка достигается благодаря тому, что в отличие от не сорбирующегося в этих условиях искомого компонента все более кислые и более щелочные примеси задерживаются на анионите или катионите соответственно. Следует отметить, что разрешающая способность этого метода невысока. Достигается разделение белков, изоточки которых различаются на 0,2—0,3 ед. рН (при хроматофокусировании эта величина составляет 0,05 ед. рН).

2.2.8. Заключительные замечания. О максимальной загрузке образцом

В этом кратком обзоре мы воздали должное изобретательности экспериментаторов, направивших свои усилия на создание и усовершенствование устройств, наиболее эффективно использующих уникальную разрешающую способность метода ИЭФ как для аналитического, так и для препаративного фракционирования. Сведения о других возможных вариантах конструирования простых и эффективных систем препаративного ИЭФ можно почерпнуть из прекрасной статьи Fawcett, 1975a.

Как мы уже знаем, некоторые из методов препаративного ИЭФ позволяют фракционировать очень большие количества белка, на уровне нескольких граммов препарата. С другой стороны, всегда считалось, что при ИЭФ в сахарозном градиенте

плотности загрузка по белку должна быть весьма ограниченной. Так, в 440-мл колонке фирмы LKB не рекомендуется фракционировать более чем несколько сот миллиграммов белка. Однако мне кажется, что в свете теоретических выкладок Rilbe, Pettersson, 1975 (разд. 1.3.8), эту точку зрения следует пересмотреть. Согласно этим авторам, при ИЭФ в линейном градиенте плотности раствора сахарозы теоретически допустимое содержание белка в зоне (m) определяется следующим неравенством:

$$m < 0{,}625 V r^2 \text{ (г/см}^3\text{)},$$

где V — полный объем колонки, а r — ширина зоны. Для колонки объемом 100 мл это означает, что

$$m < 62{,}5 r^2 \text{ (г)}.$$

Таким образом, максимальная загрузка возрастает пропорционально квадрату ширины зоны, что и было показано экспериментально (Rilbe, Pettersson, 1975). Судя по приведенному выше неравенству, в колонке объемом 110 мл при значении $r = 0{,}125$ см максимальное содержание белка в зоне может достигать 1074 мг. При работе с миоглобином авторы наносили 1050 мг, а в основном пике (MbI) обнаруживали около 800 мг белка, что соответствует 76% от нанесенного вещества и 74% от величины теоретического максимума. В работе Janson, 1972, сообщалось о фракционировании 7,3 г цитоплазматического экстракта *Cytophaga johnsonii* в колонке объемом 440 мл с сахарозным градиентом плотности. С использованием амфолинов узкого диапазона pH 6,3—7,3 в колонке объемом 110 мл проводили ИЭФ до 1 г белка из гемолизатов эритроцитов (Fawcett, 1975 а). При очистке стафилококкового α-токсина на колонку с градиентом плотности наносили 1,8 г белка (Goode, Balwin, 1973), а при работе с α-токсином *Clostridium perfringens* — даже 3,87 г белка. В работе Jonsson, Rilbe, 1980, авторы в своем гигантском многокамерном электролизере фракционировали 15 г неочищенного препарата пепсина и 13,8 г бычьего сывороточного белка. В расчете на одну белковую зону загрузка по гемоглобину достигала 7 г. Названные величины сопоставимы с допустимой загрузкой при ИЭФ в гранулированных гелях. Однако при работе с такими большими количествами белков весьма вероятно выпадение осадка. Поэтому при ИЭФ в вертикальном градиенте плотности высокая загрузка допустима только в том случае, если искомый белок образует зону, достаточно удаленную от области интенсивной преципитации других компонентов. Таким образом, с точки зрения препаративных возможностей системы ИЭФ в геле имеют определенные преимущества по сравнению с системами ИЭФ в градиенте плотности. В геле

образующийся осадок локализован вблизи зоны с данным pI и не загрязняет другие фокусируемые компоненты.

Учитывая все сказанное выше, а также сегодняшнее состояние развития различной специальной аппаратуры, я берусь утверждать, что ИЭФ должно стать одним из основных методов крупномасштабного фракционирования макромолекул. Прежде чем закончить главу, следует еще раз отметить, что, несмотря на кажущуюся доскональность, настоящий обзор не в состоянии охватить все возможные подходы к препаративному ИЭФ. Кстати, есть еще по крайней мере один, как мне кажется, весьма революционный подход к проблеме. Однако поскольку он пока принадлежит к числу «тайных замыслов» моей лаборатории, то боюсь, что любознательному читателю придется потерпеть до следующего издания этой книги.

ГЛАВА 3

Аналитическое изоэлектрофокусирование

Хорошей аналитической системой можно назвать такую систему фракционирования, которая позволяет добиться высокого разрешения при минимальных затратах времени и материалов. Желательно, чтобы техническое оснащение аналитического эксперимента было не слишком сложным, позволяло анализировать одновременно значительное число образцов и включало удобную систему регистрации данных. Хотя исторически первые системы колоночного ИЭФ в градиенте плотности использовались в том числе и в аналитических целях, они, несомненно, не были приспособлены для рутинного анализа многочисленных образцов. Для ИЭФ даже в самой маленькой из имевшихся в продаже колонок объемом 110 мл требовались значительные количества материала. Кроме того, на проведение одного анализа от начала до конца уходило, как правило, несколько дней. Собственно фокусирование длилось 2—3 сут. Последующий анализ фракций, полученных после элюции, был также весьма продолжительным и трудоемким.

Делались попытки сконструировать колонки меньших размеров, в большей степени приспособленные для ускоренного аналитического ИЭФ. Было предложено много остроумных решений, которые, впрочем, по большей части не нашли широкого применения на практике. Помимо неудобств, связанных с необходимостью элюции и анализа многочисленных фракций, непригодность многих систем определялась еще и рядом специфических проблем, возникающих при работе в жидкостном градиенте плотности. Главным образом это проблемы конвекционного перемешивания и изоэлектрической преципитации в процессе ИЭФ, а также диффузии и размывания зон при элюции. Дополнительные потери разрешения возникали из-за того, что объемы собираемых фракций часто превышали объемы индивидуальных сфокусированных зон. Некоторые из указанных проблем удавалось решить с помощью непосредственного сканирования колонки или пропускания элюата через проточную кювету детектора. И все же надо признать, что лишь немногие

из систем ИЭФ в градиенте плотности характеризуются всем набором параметров, которые отвечают требованиям быстрого и удобного метода анализа микроколичеств многочисленных образцов.

В этой главе сначала будут рассмотрены методы аналитического ИЭФ в жидкой среде, а затем более подробно — системы аналитического ИЭФ в геле, которые за последнее время приобрели несравненно большую популярность. Провести четкую границу между методами аналитического и препаративного фракционирования довольно трудно. Строго говоря, любая аналитическая система, позволяющая выделить фракционируемые компоненты, может быть с таким же успехом названа препаративной. Понятие о «препаративности» метода зависит и от конкретных потребностей — или на лабораторном, или же на промышленном уровне.

Некоторые из описанных ниже систем жидкостного ИЭФ, рассматриваемые здесь в качестве «аналитических», в масштабах лаборатории могут использоваться и как препаративные. В настоящем изложении я придерживаюсь некоторого условного разграничения и отношу системы, работающие на уровне от микрограммов до миллиграммов образца, к аналитическим, а на уровне от миллиграммов до граммов — к препаративным.

3.1. ИЭФ в градиенте плотности с использованием небольших колонок

Одновременно с развитием техники ИЭФ в гелях некоторые исследовательские группы продолжали разработку новых конструкций колонок малого объема для ИЭФ в градиенте плотности. В работе Weller et al., 1968, описаны две небольшие U-образные колонки для полупрепаративного ИЭФ: одна колонка диаметром 1,0 см с рабочим объемом 11 мл, другая — диаметром 1,9 см с рабочим объемом 33 мл. В этих колонках одно колено (вспомогательное) заполняется только «нижним» электродным раствором (обычно это католит), а другое колено (разделительное) — рабочим сахарозным градиентом плотности и поверх него вторым электродным раствором (анолитом). Для отвода тепла колонку помещают в холодную комнату или в ререзервуар с холодной водой. После окончания ИЭФ анод удаляют и в разделительное колено до самого дна погружают трубку сифона. С помощью сифона содержимое колонки раскапывают по пробиркам.

Аналогичная система для быстрого ИЭФ многочисленных образцов на уровне микроколичеств была предложена Godson, 1970. В этой системе фракционирование проводится в стеклянной, так называемой J-образной трубке (рис. 3.1) с наружным

диаметром 1,1 см, внутренним диаметром 0,9 см и полным объемом 10 мл. J-образные трубки по размеру подходят к обычному аппарату для электрофореза в цилиндрических гелях. Одновременно можно проводить ИЭФ в восьми отдельных трубках. Более длинное колено трубки (25 см) содержит сахарозный градиент плотности и функционирует как разделительная колонка. В коротком колене (16 см) находится «подушка» тяжелого электродного раствора; в верхней его части располагается электрод (как правило, катод). Почти вся трубка погружена в охлаждаемую посредством внешней рубашки нижнюю камеру прибора, заполненную электролитом, который перемешивается с

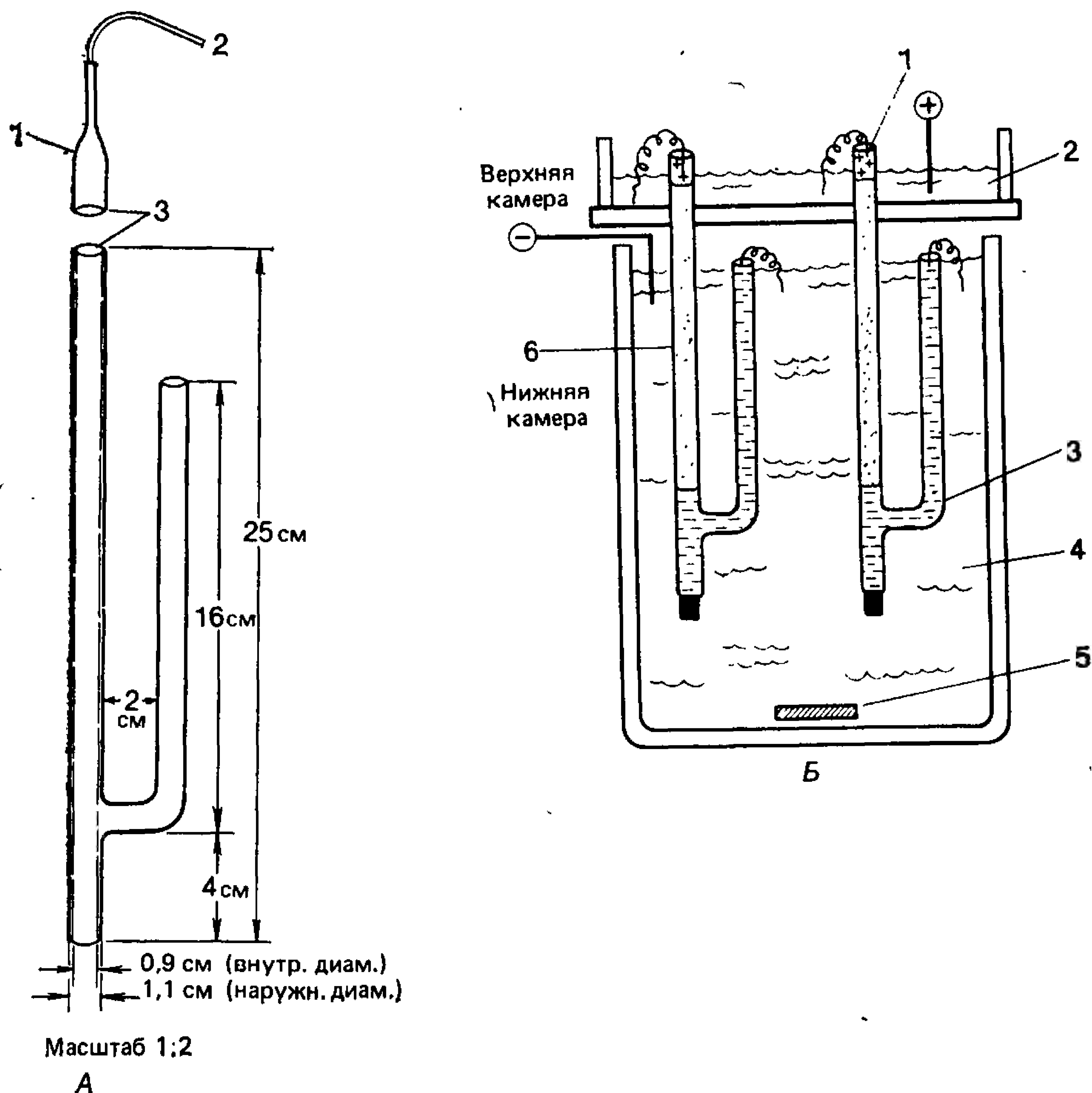


Рис. 3.1. J-образные трубки для ИЭФ с использованием обычного аппарата для электрофореза в цилиндрических гелях. *А*. Размеры J-образной трубки и устройство системы элюции. 1 — съемная насадка для элюции, 2 — тонкий шланг к коллектору фракций, 3 — притертые поверхности контакта. *Б*. Трубки в рабочем положении. 1 — легкий анолит, 2 — раствор электролита (H_2SO_4), 3 — тяжелый католит, 4 — раствор электролита, 5 — магнитная мешалка, 6 — амфолины (градиент pH). (Godson, 1970.)

помощью магнитной мешалки. Верхние концы длинного и короткого колен J-образной трубки (анолит и католит) соединяются с электролитом, заполняющим верхнюю и нижнюю камеры соответственно, с помощью коротких петель из платиновой проволоки. По окончании ИЭФ к разделительному колену трубки присоединяют коническую стеклянную насадку. Через нее содержимое колонки постепенно вытесняют, подавая в малое колено концентрированный раствор сахарозы, и раскапывают по фракциям. Аналогичные системы ИЭФ с использованием J-образных трубок описаны также в работе Koch, Backx, 1969.

В последние несколько лет в группе Рильбе шла разработка систем для ИЭФ в маленьких ячейках с очень крутым градиентом плотности и высокостабильным градиентом pH. Была описана кварцевая ячейка в форме параллелепипеда длиной 14 см и объемом 11,2 мл (Rilbe, 1970). Фокусирование в ней продолжается всего 6—7 ч, но стоимость укомплектованной ячейки непомерно высока. В поисках более доступного оборудования Рильбе и его сотрудники обнаружили, что обычная проточная термостатируемая спектрофотометрическая кювета может быть легко превращена в хорошую колонку для ИЭФ. В работах Rilbe, 1973 b, Jonsson et al., 1973, сообщается об использовании для ИЭФ проточной кюветы типа 167-QI производства западногерманской фирмы Hellma GMBH (Mullheim, Baden, West Germany). Центральное отделение кюветы является собственно разделительной колонкой; ее размеры 4×10×35 мм и объем 1,4 мл. Поскольку ИЭФ проводится в очень малом объеме, весь процесс занимает всего 2,5 ч, включая время, необходимое для приготовления градиента плотности и сканирования. Фокусирование протекает непосредственно в спектрофотометре, поэтому для сканирования градиента во время или после ИЭФ достаточно установить соответствующее подъемное устройство и фиксированную горизонтальную щель. Для своей работы Рильбе использовал спектрофотометр марки Vitatron Universal Photometer. Помимо сканирования в конструкциях такого типа можно снимать и спектры поглощения отдельных белковых зон. Это позволяет изучать химические превращения белков при воздействии каких-либо ионизированных реагентов, мигрирующих по колонке, в которой предварительно были сфокусированы исследуемые белки. Так, удавалось наблюдать за восстановлением сфокусированного метмиоглобина кашалота до миоглобина под влиянием небольших количеств дитионата натрия, инъецированного в колонку со стороны катода (Rilbe, 1973 b). Последующее добавление небольшого количества феррицианида калия, также со стороны катода, вызывало обратный переход миоглобина в окисленную Fe^{3+}-форму. Об этих превращениях судили по соответствующим изменениям в характерных спект-

рах поглощения обеих форм белка. Казалось бы, определение рН-профиля в такой микроколонке является почти невыполнимой задачей. Тем не менее в работе Fredriksson, 1972, описан метод микрофракционирования содержимого проточной кюветы после ИЭФ, позволяющей получать фракции объемом 60 мкл. Для измерения рН во фракциях использовалась микроэлектродная ячейка E 5021 (датской фирмы Radiometer, Copenhagen, Denmark). В этой ячейке стеклянная рН-чувствительная мембрана сделана в виде горизонтального капилляра, который заполняется жидкостью, засасываемой через вертикальную полиэтиленовую трубочку. Для определения рН достаточно всего лишь 20 мкл образца.

В литературе описаны и многие другие системы аналитического или полупрепаративного ИЭФ в градиенте плотности. Некоторые из них основаны на применении обычной аппаратуры для электрофореза в трубках. Для жидкостного ИЭФ применяют трубки, нижняя часть которых закрыта полупроницаемой пробкой из агарозного (Massey, Deal, 1973) или полиакриламидного (Behnke et al., 1975) геля или же диализной мембраной (Hotlund, Kristensen, 1978). В других системах в качестве разделительной камеры используются хроматографические колонки объемом 10—15 мл (Kint, 1975) и различные варианты U-образных ячеек объемом 10 и 30 мл (Osterman, 1970, Doi, Ohtsuru, 1974) или J-образных трубок (Korant, Lonberg-Holm, 1974; Azuma et al., 1977).

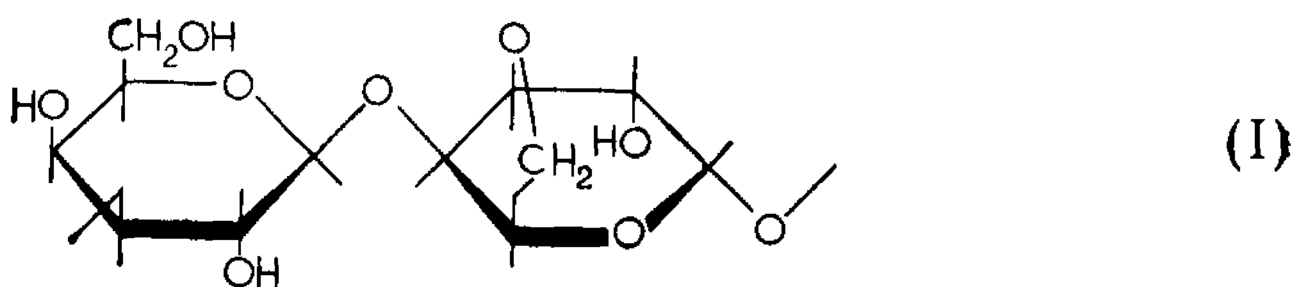
3.2. Аналитическое ИЭФ в гелях

До тех пор пока мы ставим свои опыты по ИЭФ в поле земного тяготения, у нас нет никаких шансов избежать «гравитационных» искажений белковых зон, фокусируемых в свободной жидкости. В самом деле, как только белковые или другие макромолекулы перестают быть равномерно распределенными по всему объему проводящей жидкости и концентрируются в виде зоны, плотность в этой зоне оказывается выше, чем в окружающем растворе. И если перепад давления на границе такой зоны ничем не компенсируется, то неизбежно возникают конвекционные потоки, которые стремятся свести на нет порожденную электрическим полем неравномерность распределения вещества в растворе. Таким образом, для того чтобы получить неискаженную белковую зону, необходимо вводить «капиллярную» систему стабилизации, которая предотвращает конвекционное перемешивание жидкости. Всевозможные варианты стабилизирующих капиллярных сред были опробованы при разработке традиционных электрофоретических методов разделения макромолекул. По-видимому, самая первая такая система —

электрофорез на бумаге — была разработана в 1939 г. в Бразилии (Von Klobusitzky, Köning, 1973) для фракционирования яда змеи *Bothrops jararaca*. В дальнейшем использовались и многие другие стабилизирующие среды, в том числе картофельный крахмал (Kunkel, Slater, 1952), целлюлозный порошок (Haglund, Tiselius, 1950), этилцеллюлоза (Flodin, Kupke, 1956), стеклянный порошок (Hocevar, Northcote, 1957), минеральные соли (Strain, 1939), асбест (Butler, Stephen, 1947), силикагель (Consden et al., 1946), губчатая резина (Mitchel, Herrenberg, 1957), желатина (Van Orden, 1971) и гель поливинилового спирта (Reich, Sieber, 1966). Перечисленные матрицы по большей части не подходят для ИЭФ, многие из них на своей поверхности несут заряженные группы. Ввиду низкой ионной силы рабочего раствора при ИЭФ (Righetti, 1980) наличие иммобилизованных заряженных групп будет неизбежно препятствовать нормальному образованию градиента pH. Последующее обсуждение ограничено только тремя типами антиконвекционных сред, которые на сегодняшний день нашли широкое применение для ИЭФ. Это агарозные и полиакриламидные гели и ацетилцеллюлозные пленки.

3.2.1. Строение агарозной матрицы

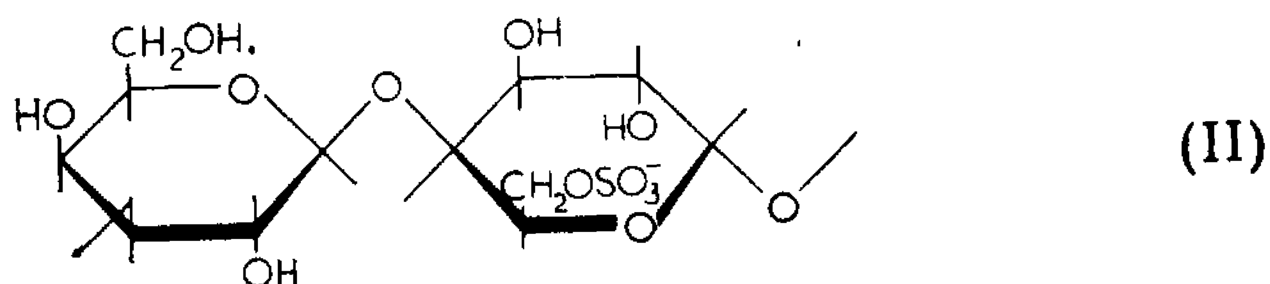
Агарозой называется чистый гидроколлоидный неразветвленный галактан, выделенный из агара или непосредственно из агаробразующих морских водорослей, в частности из красных водорослей класса Rhodophyta. Впервые агароза была использована в качестве поддерживающей среды для зонального электрофореза вместо применявшихся ранее агаровых гелей в работах Hjertén, 1961, 1962. Считается, что агар представляет собой смесь полимеров — нейтральной агарозы и заряженного агаропектина (Araki, 1956). Было показано, что полимерная цепь агарозы образована чередующимися остатками β-D-галактопиранозы и 3,6-ангидро-α-L-галактопиранозы, соединенными в цепь гликозидными связями 1—4 и 1—3 соответственно. Строение повторяющегося звена полимера — дисахарида агаробиозы — показано на схеме (I):



(I)

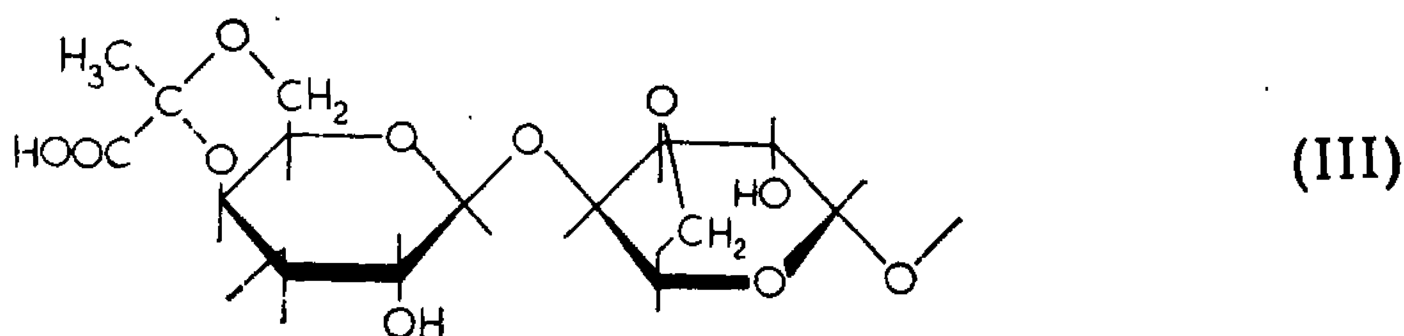
На самом деле даже так называемая «нейтральная» фракция, т. е. собственно агароза, содержит некоторое число заряженных

групп, представленных остатками L-галактозо-6-сульфата (II)



(II)

и продуктами модификации галактозы пировиноградной кислотой, построенными по типу кеталя — 4,6-(1-карбоксиэтилиден)-D-галактозы (III)



(III)

Было найдено, что «слабозаряженная» агароза (с содержанием серы от 0,99 до 0,18%) подходит для большинства электрофоретических методов разделения, но все же не соответствует требованиям, которые предъявляет ИЭФ. Препараты агарозы более высокого качества удается получить с помощью хроматографической очистки на QAE-сефадексе (Johansson, Hjertén, 1974) или на DEAE-сефадексе (Duckworth, Yaphe, 1971), а также после щелочной обработки (Porath et al., 1971) или щелочного десульфирования в присутствии боргидрида натрия с последующим восстановлением алюмогидридом лития в диоксане (Lääs, 1972).

Агароза более всего подходит для ИЭФ потому, что она образует гели с необычайно крупными порами, значительно более широкими, чем поры в каком-либо другом геле. В работе Righetti et al., 1981b, проводилась калибровка по пористости агарозных гелей различной концентрации, и было найдено, что самый разбавленный гель, который еще может быть использован для ИЭФ (содержание агарозы 0,16%), характеризуется средним диаметром пор около 500 нм. В работе Serwer, 1980, описаны гели, приготовленные из агарозы HGT(P) производства фирмы Miles, с концентрацией около 0,075%, что должно соответствовать среднему диаметру пор около 800 нм.

Каким же образом агароза может формировать такую крупнопористую структуру? Было показано, что этот полисахарид в растворе существует в виде двойной спирали (Arnott et al., 1974; рис. 3.2, *слева*) и, таким образом, имеет значительно более жесткую структуру, чем, скажем, полиакриламидная цепь. Кроме того, от семи до одиннадцати таких спиралей образуют длинные жесткие пучки (рис. 3.2, *справа*), которые переплета-

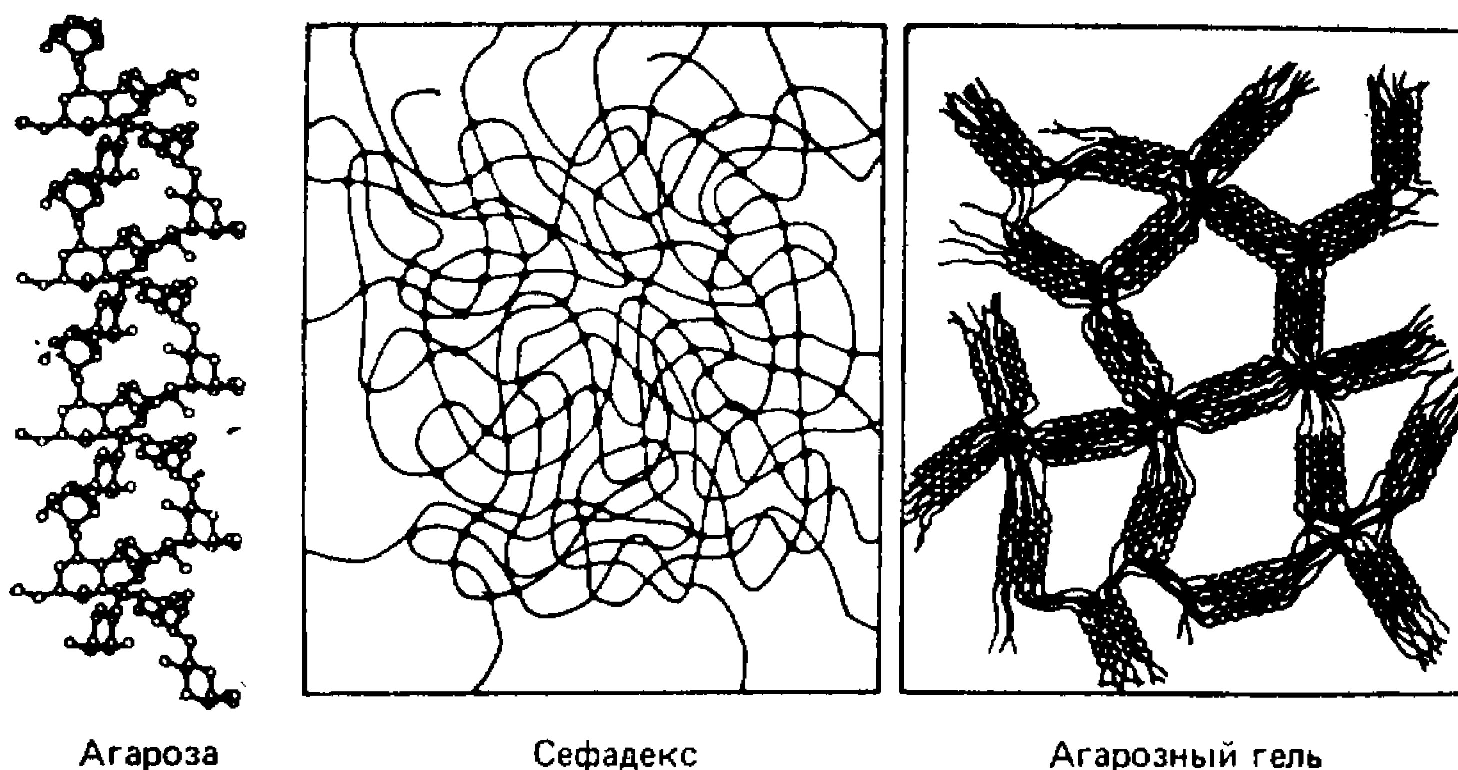


Рис. 3.2. *Слева*: двойная спираль агарозы, вид сбоку, перпендикулярно оси спирали. Гидроксильные группы расположены по периметру спирали. *В центре и справа*: сравнение схематически изображенных пространственных сеток агарозного геля (справа) и сефадекса (в центре), сформировавшихся при сходных концентрациях свободных полимерных цепей. Обратите внимание на дополнительную агрегацию двойных спиралей в геле агарозы, которая в значительной мере повышает прочность матрицы. (Arnott et al., 1974.)

ются между собой и формируют чрезвычайно прочную пространственную сетку геля. Судя по всему, образование гидрофильных гелей с размером пор более чем 500—800 нм невозможно, потому что такая структура будет разрушаться просто под действием собственного веса. В действительности агарозный гель представляет собой неравновесную систему, которая перестраивается с образованием более компактной структуры. Этот процесс сопровождается синерезисом, или частичным отторжением воды из геля при хранении. Получать структуры с пористостью более 1 мкм можно только на основе кремнезема, т. е. при капиллярной стабилизации в системе силикагеля (Haller, 1965).

3.2.2. Структура и свойства полиакриламидных гелей

Полиакриламидные гели, впервые описанные Raymond, Weintraub, 1959, и в дальнейшем охарактеризованные в работах Ornstein, 1964, и Davis, 1964, принадлежат к числу самых универсальных и самых популярных матриц в области методов электрофоретического фракционирования. Их привлекательность обусловлена рядом важнейших характеристик, таких, как

а) оптическая прозрачность, в том числе и в ультрафиолетовой области (280 нм);

б) электронейтральность — ввиду отсутствия заряженных групп (в отличие от крахмального геля, содержащего карбоксильные группы, и агарозного геля, содержащего и карбоксильные, и сульфогруппы);

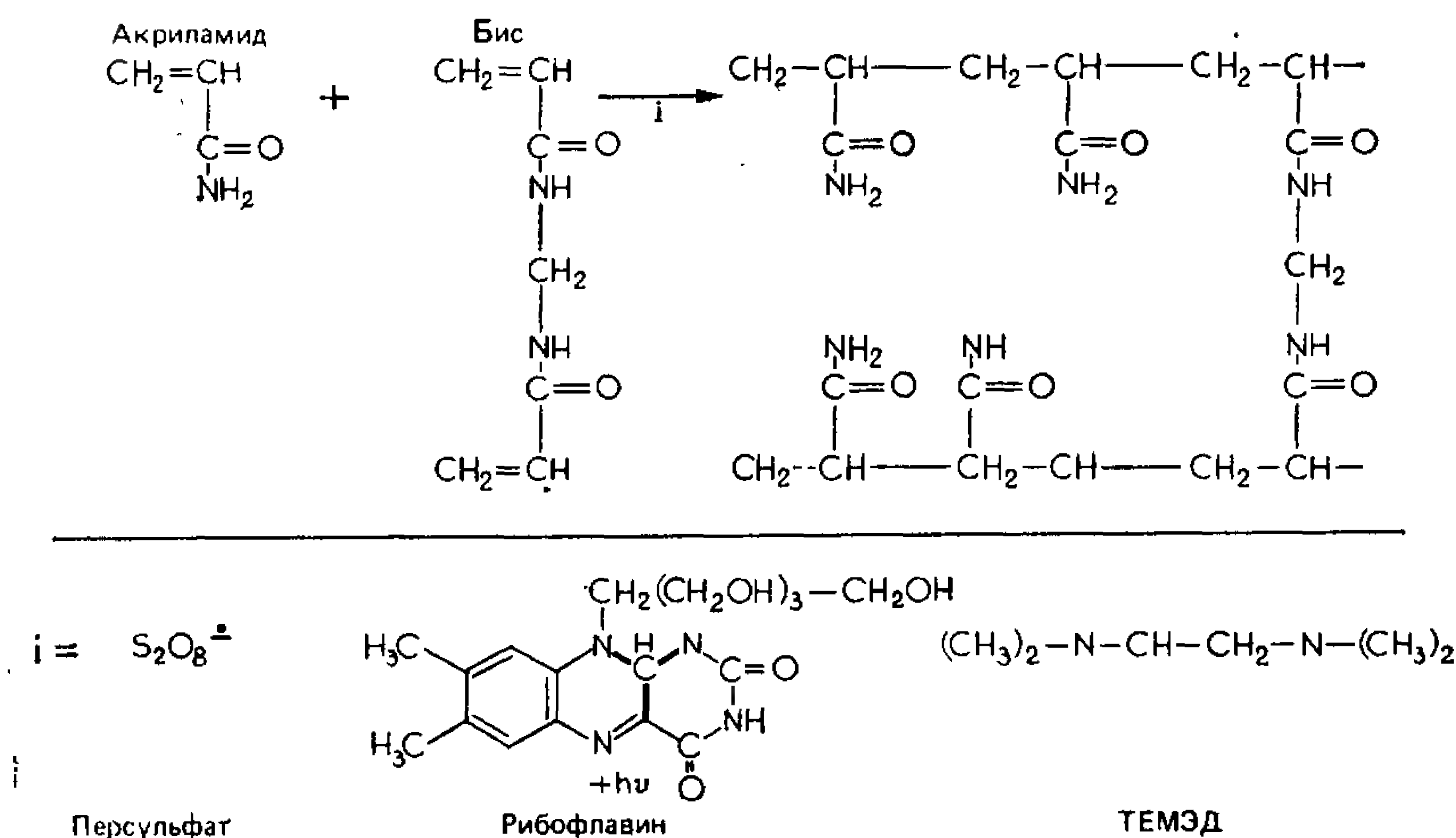


Рис. 3.3. Химические реакции при полимеризации акриламидного геля. Приведены структурные формулы мономеров: акриламида и N,N′-метиленбисакриламида (бис), а также типичного «сшитого» полимерного фрагмента. Символом i обозначены изображенные на рисунке внизу инициаторы полимеризации — персульфат или рибофлавин (+*h*ν — свет), а также катализатор N,N,N′,N′-тетраметилэтилендиамин. (Chrambach, Rodbard, 1971.)

в) возможность варьировать размер пор в широких пределах.

На рис. 3.3 показано химическое строение ПААГ, который, как правило, получают сополимеризацией акриламида и N,N′-метиленбисакриламида (бис). Приведены формулы наиболее распространенных инициаторов полимеризации — персульфата аммония (или калия) и рибофлавина, а также катализатора полимеризации — N,N,N′,N′-тетраметилэтилендиамина (ТЕМЭД).

Недавно были опубликованы работы, в которых рассматривается зависимость кинетики полимеризации от химической природы «сшивки» (Gelfi, Righetti, 1981a), от температуры (Gelfi, Righetti, 1981b) и от эффекторов (Gelfi, Righetti, 1981c). Различные реагенты, применяемые для образования поперечных сшивок между полиакриламидными цепями, перечислены в табл. 3.1. Общие свойства полиакриламидных гелей обсуждаются в обзорах Chrambach, Rodbard, 1971; Chrambach et al., 1976, и Tanaka, 1981.

Считается, что гидрофильный гель представляет собой пространственную сетку из гибких полимерных цепей, в промежутках между которыми макромолекулы мигрируют под действием электрического поля. Распределение макромолекул по эффективным скоростям миграции определяется стерическими факто-

Таблица 3.1. Структура реагентов, применяемых для «сшивки» ПААГ (По Righettli et al., 1981)

Название	Обозначение	Химическая формула	M_r	Число атомов в основной цепи
N,N′-метиленбисакриламид	Бис (МБА)	$CH_2{=}CH{-}C({=}O){-}NH{-}CH_2{-}NH{-}C({=}O){-}CH{=}CH_2$	154	9
Этилендиакрилат	ЭДА	$CH_2{=}CH{-}C({=}O){-}O{-}CH_2{-}CH_2{-}O{-}C({=}O){-}CH{=}CH_2$	170	10
N,N′-(1,2-дигидроксиэтилен)бисакриламид	ДГЭБА	$CH_2{=}CH{-}C({=}O){-}NH{-}CH(OH){-}CH(OH){-}NH{-}C({=}O){-}CH{=}CH_2$	200	10
N,N′-диаллилтартардиамид	ДАТД	$CH_2{=}CH{-}CH_2{-}NH{-}C({=}O){-}CH(OH){-}CH(OH){-}C({=}O){-}NH{-}CH_2{-}CH{=}CH_2$	288	12
N,N′,N″-триаллилцитраттриамид	ТАЦТ	$CH_2{=}CH{-}CH_2{-}NH{-}C({=}O){-}CH_2{-}C(OH)(C({=}O){-}NH{-}CH_2{-}CH{=}CH_2){-}CH_2{-}C({=}O){-}NH{-}CH_2{-}CH{=}CH_2$	292	13
Поли(этиленгликоль)-диакрилат-200	ПЭГДА$_{200}$	$CH_2{=}CH{-}C({=}O){-}O{-}CH_2{-}CH_2{-}O{-}CH_2{-}CH_2{-}O{-}C({=}O){-}CH{=}CH_2$	214	13
N,N′-бисакрилилцистамин	БАЦ	$CH_2{=}CH{-}C({=}O){-}NH{-}CH_2{-}CH_2{-}S{-}S{-}CH_2{-}CH_2{-}NH{-}C({=}O){-}CH{=}CH_2$	260	14
Поли(этиленгликоль)-диакрилат-400	ПЭГДА$_{400}$	$CH_2{=}CH{-}C({=}O){-}O{-}CH_2{-}CH_2{-}O{-}CH_2{-}CH_2{-}O{-}CH_2{-}CH_2{-}O{-}CH_2{-}CH_2{-}O{-}CH_2{-}CH_2{-}O{-}CH_2{-}CH_2{-}O{-}C({=}O){-}CH{=}CH_2$	400	25

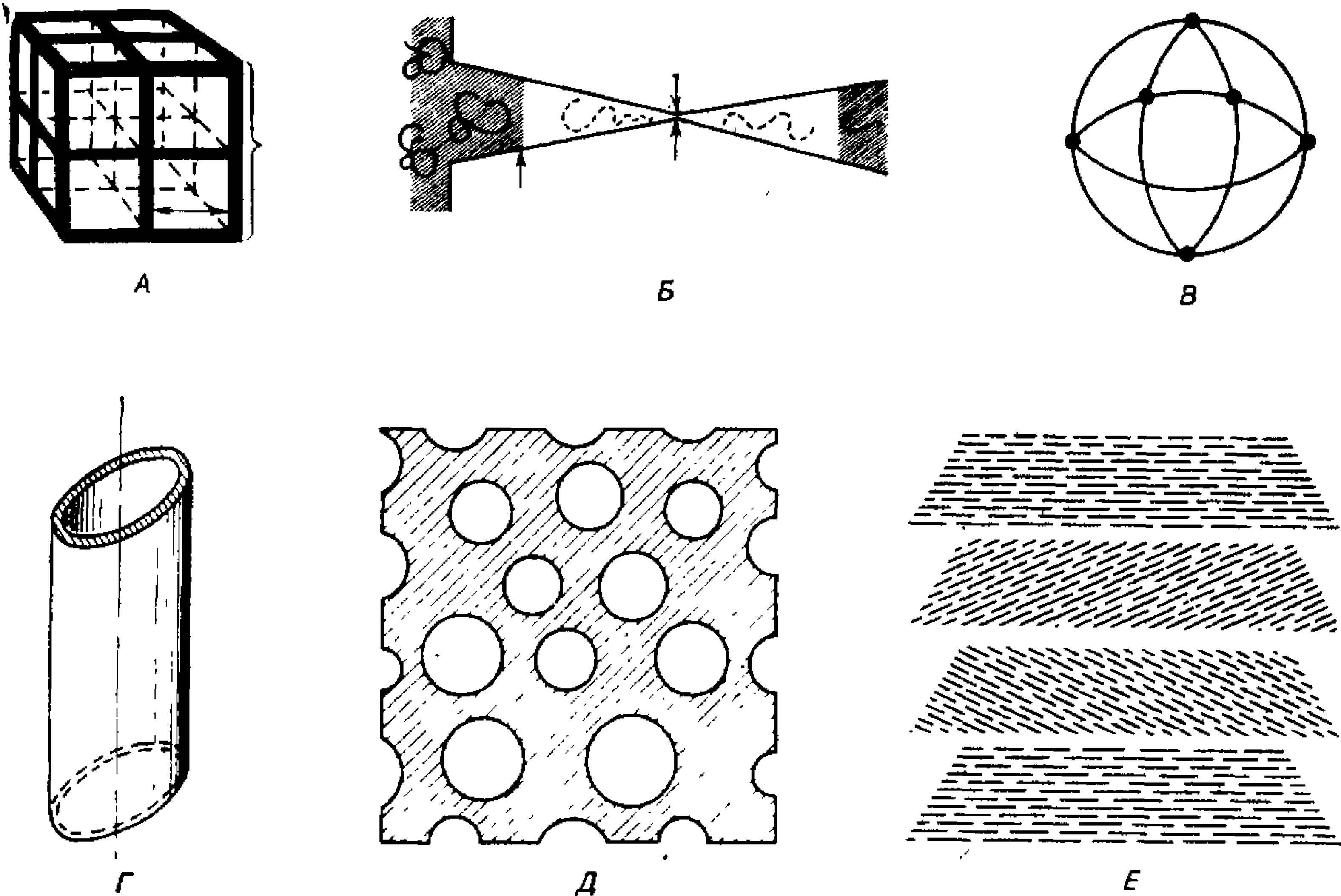


Рис. 3.4. Сопоставление различных геометрических моделей строения пор в геле. *А* — по Ornstein, 1964; *Б* — по Porath, 1963; *В*, *Г*, *Е* — по Casassa, 1967; *Г*, *Д* — по Ackers, 1967; *Б*, *Г*, *Е* — по Squire, 1964. (Righetti, 1981.)

рами. Большие молекулы способны проникать только в крупные ячейки пространственной сетки. В то же время для малых молекул доступны и другие, более плотные участки сетки, примыкающие к точкам пересечения ее цепей. Таким образом, коэффициент распределения определяется той долей общего рабочего пространства геля, которая доступна для макромолекул данного типа (Flodin, 1961). Для описания структуры геля были предложены различные модели — геометрическая, статистическая и термодинамическая. Характерный набор вариантов в рамках геометрической модели проиллюстрирован на рис. 3.4. Первые гипотезы о геометрическом строении пор были высказаны в работе Porath, 1963, в которой предполагалось, что поры имеют коническую форму (рис. 3.4, *Б*). В работе Squire, 1964, предлагался более широкий набор форм и высказывалось предположение о том, что реальная структура геля представляет собой композицию одинаковых количеств конических, цилиндрических (рис. 3.4, *Г*) и щелевидных пор. Одна из последних гипотез аппроксимирует систему пор сеткой «трещин в стене». Такое геометрическое представление можно проиллюстрировать стопкой параллельных плоскостей, изображенных на рис. 3.4, *Е*. В работе Ackers, 1964, также рассматривалась цилиндрическая

структура пор. Автор считал, что сечения цилиндров — окружности — лежат в плоскости, перпендикулярной направлению миграции молекул (рис. 3.4, *Д*). Проводились также статистические расчеты относительной вероятности распределения гибких полимерных молекул с образованием полостей, имеющих форму сфер, цилиндров или плоских щелей (Casassa, 1967). В работе Ornstein, 1964, высказывалось предположение о том, что полимерные цепи в полиакриламидном геле располагаются вдоль ребер куба в гипотетической кубической ячейке матрицы (рис. 3.4, *А*). Одна из самых первых моделей была основана на принципе «хаотической сетки волокон» (Ogston, 1958). Автор модели рассчитал, какая часть пространства такой сетки оказывается доступной для сферической частицы с радиусом r_s при условии, что сетка образована цилиндрическими палочками с радиусом r_r, распределенными в пространстве случайным образом. Средняя плотность сетки выражалась как L единиц длины палочки, которые приходятся на единицу рабочего объема. Эта модель получила дальнейшее развитие в работе Laurent, Killander, 1964, где разделяемые молекулы рассматривались как сферы определенного радиуса, а составляющие сетки — как бесконечно длинные прямые цепи, хаотически расположенные в пространстве. Среди других «неупорядоченных» (случайных) моделей следует отметить и модель, предложенную Giddings et al., 1968, в которой рассматривается гипотетическая изотропная сетка статистически расположенных плоскостей. Предполагается, что в пространственной структуре геля в равной степени представлены плоскости всех возможных ориентаций.

Чтобы не конкретизировать геометрию пор при оценке распределения макромолекул в геле, были предложены различные статистические калибровочные функции, связывающие размер макромолекулы с доступным для нее парциальным объемом рабочего пространства. В частности, в работе Hohn, Pollmann, 1963, предполагалось, что параметр K_{av} связан с молекулярной массой по типу больцмановского распределения. Это предположение подтвердилось в случае олигонуклеотидов. В то же время в работе Ackers, 1967, считалось, что суммарный объем участков геля, доступных для молекул данного радиуса, определяется с помощью нормального (гауссова) распределения. В работе Rodbard, 1976, предлагалось описывать распределение размера пор с помощью «логарифмически-нормального» закона, т. е. считать, что гауссовому распределению подчиняется логарифм диаметра пор. Это лучше согласуется с экспериментальными данными по изучению распределения радиуса пор в полиакриламидных гелях (Fawcett, Morris, 1966). В качестве дополнительного усовершенствования своей модели автор (Rodbard, 1976) предложил использовать «логистическое» распределение, позволяю-

щее получить простые уравнения, которые легче обрабатываются с помощью обычного настольного калькулятора или графически, с помощью специальной логарифмической сетки.

Другой подход, позволяющий обойтись без рассмотрения конкретной геометрии пор, может быть сделан с помощью классической термодинамики, описывающей распределение вещества между двумя фазами. Так, для распределения клеток между двумя несмешивающимися жидкостями было предложено термодинамическое описание, основанное на соотношениях типа уравнений Бренстеда (Albertsson, 1960). Этот подход получил дальнейшее развитие в работе Fisher, 1969, где были рассчитаны термодинамические параметры переноса растворенного вещества между свободной жидкостью и жидкостью, связанной с матрицей геля.

Качественно иная термодинамическая модель (Bode, 1980) объясняет молекулярно-ситовые явления в полиакриламидном геле исходя из свойств гипотетической «вязкой эмульсии», состоящей из двух жидкостей с разными коэффициентами сопротивления. В этой модели гель представляется в виде вязко-эластичного матрикса, образованного параллельными слоями, каждый из которых содержит подвижные полимерные цепи, формирующие некоторую сетку неопределенной структуры. Тепловые колебания цепей происходят симметрично относительно средней плоскости каждого слоя. Подвижность полимерных цепей порождает силы сопротивления, направленные против внедрения какого-либо компактного объекта, который может частично заполнить объем, ранее доступный для полимерных цепей, подверженных тепловым колебаниям.

В действительности выбор способа описания структуры геля не имеет большого значения. Гораздо более важный вопрос заключается в том, как связать размер пор с реальной концентрацией (мономерного или полимерного) материала, используемого для приготовления геля. Было предложено четыре различных уравнения, связывающих средний диаметр пор ($\bar{p}$) с концентрацией геля (c) (см. рис. 3.5): $\bar{p} \sim c^{-0,5}$ (Raymond, Nakamichi, 1962), $\bar{p} \sim c^{-1}$ (Tombs, 1965), $\bar{p} \sim c^{-0,3}$ (Rodbard, Chrambach, 1970), $\bar{p} \sim c^{-0,7}$ (Righetti et al., 1981b). Чем объяснить такое расхождение в данных различных исследовательских групп? На самом деле взаимно противоречащими можно считать только два первых уравнения, которые относятся к однотипным полиакриламидным гелям с традиционным уровнем «сшивки» (3—5% C)[1]. По данным Rodbard, 1976, для гелей этого типа уравнение

[1] Параметры C и T вводятся в разд. 3.2.8. — *Прим. перев.*

$\bar{p} = Kd/\sqrt{c}$ (Raymond, Nakamichi, 1962)

$\bar{p} = \frac{K'd}{c} + K''$ (Tombs, 1965)

$\bar{p} \propto 1/\sqrt[3]{c}$ (Rodward, Chrambach, 1970)

$\bar{p} = 140{,}7\ c^{-0{,}7}$ (Righetti, Brost, Snyder, 1981)

Рис. 3.5. Уравнения, предложенные для описания зависимости между средним размером пор ($\bar{p}$) и концентрацией геля (c). Первые три уравнения были выведены для полиакриламидных, а четвертое — только для агарозных гелей. (Righetti, 1981.)

должно иметь вид, близкий к $\bar{p} \sim c^{-0{,}5}$. Два последних уравнения были выведены для гелей разного типа и соответственно разной структуры. Зависимость $\bar{p} \sim c^{-0{,}3}$ относится к агрегированной структуре высокосшитых полиакриламидных гелей (разд. 3.2.3). Зависимость $\bar{p} \sim c^{-0{,}7}$ отвечает очень разбавленным агарозным гелям (0,16—1%), т. е. системе, организацию которой в первом приближении можно считать идеальной. При более высоких концентрациях полимера, таких, как в обычных полиакриламидных гелях, могут возникнуть искажения регулярной структуры, например в результате перепутывания цепей (Ziabicki, 1979). Таким образом, в этих системах уменьшение размера пор с изменением концентрации может происходить быстрее, чем это следует из нашего уравнения. Отмечалось, что предельный размер пор в полиакриламидном геле достигает 500 нм (разд. 3.2.3), а в агарозном геле — 500—800 нм. Однако эти значения следует рассматривать как динамические, а не как фиксированные величины. Поскольку соответствующие измерения проводились с помощью заряженных частиц латекса, мигрирующих в геле под действием электрического поля, не исключено, что эти частицы могут механически «раздвигать» нити матрицы и таким образом перемещаться сквозь пространственную сетку геля. При этом истинное значение диаметра тех же самых пор может быть на самом деле меньше, чем динамическое значение, получаемое экспериментальным путем (Righetti et al., 1981b). Это согласуется с данными работы Gordon, 1975, которые свидетельствуют о том, что при обычной диффузии макромолекул в геле эффективный размер пор оказывается меньше, чем в условиях электрофореза. Дополнительный практический вывод, который можно сделать на основании этого наблюдения, заключается в том, что для извлечения макромолекул из геля лучше использовать электрофоретическую элюцию, а не чисто диффузионные методы (разд. 4.6).

3.2.3. Высокосшитые гели. Применение различных типов сшивающих агентов

Увеличить размер пор в полиакриламидном геле можно двумя способами. Во-первых, можно использовать очень «разбавленные» гели (минимальные значения *T* и *C* равны 2 и 2,2% соответственно; Shaaya, 1976). Во-вторых, существенно повысить процентное содержание (*C*) сшивающего агента («сшивки») при неизменном общем содержании мономеров (% *T* — акриламид+«сшивка») (Fawcett, Morris, 1966). Клейкие и непрочные «разбавленные» полиакриламидные гели очень неудобны в обращении. Кроме того, размер пор в них не превышает 80 нм (Righetti et al., 1981b). Более благоприятная ситуация реализуется при использовании крупнопористых гелей с высоким содержанием «сшивки». По сути дела, этот подход был впервые использован в работе Davis, 1964, где крупнопористый (концентрирующий) гель при диск-электрофорезе имел состав 3% *T*, 20% $C_{бис}$. Гели с 50% *C* практически не обнаруживают молекулярно-ситовых явлений по отношению к макромолекулам с мол. массой до нескольких миллионов (Rodbard, 1972).

Характер изменений в пространственной структуре высокосшитых гелей был эффектно продемонстрирован с помощью электронной микроскопии (Rüchel, Brager, 1975; Rüchel et al., 1978). Крестообразная диаграмма на рис. 3.6 наглядно показывает, каким образом изменяется структура матрицы в зависимости от величины отношения *T*/*C*. По горизонтали креста видны структурные изменения, которые происходят при повышении *T* при фиксированном относительном содержании «сшивки» (*C*=5%). Начиная с крупнопористых «разбавленных» гелей (*T*=2,5%) размер пор непрерывно и монотонно уменьшается вплоть до образования очень плотной сетки матрицы с высоким значением *T* (до 40%). Если же проследить за процессами, происходящими с матрицей в результате изменения содержания сшивки при фиксированном *T* (10%), то можно увидеть качественно иную картину. Как показано на рис. 3.6, на обоих концах вертикали креста как при очень низких (0,2%), так и при очень высоких (20% и выше) значениях *C* образуются крупнопористые гели. Изменение пористости в зависимости от *C* фактически описывается параболой с минимумом вблизи точки *C*=5%. Это объясняет полученные ранее экспериментальные данные о том, что максимальное замедление миграции макроионов происходит в гелях с C=5—7% (Fawcett, Morris, 1966; Hjertén et al., 1969; Margolis, Wrigley, 1975).

Трактовка явления крупнопористости гелей с высоким значением *C* была предложена в работах Gelfi, Righetti, 1981a,b, и Righetti, 1981. В самом деле, при низких значениях *C* (2—4%)

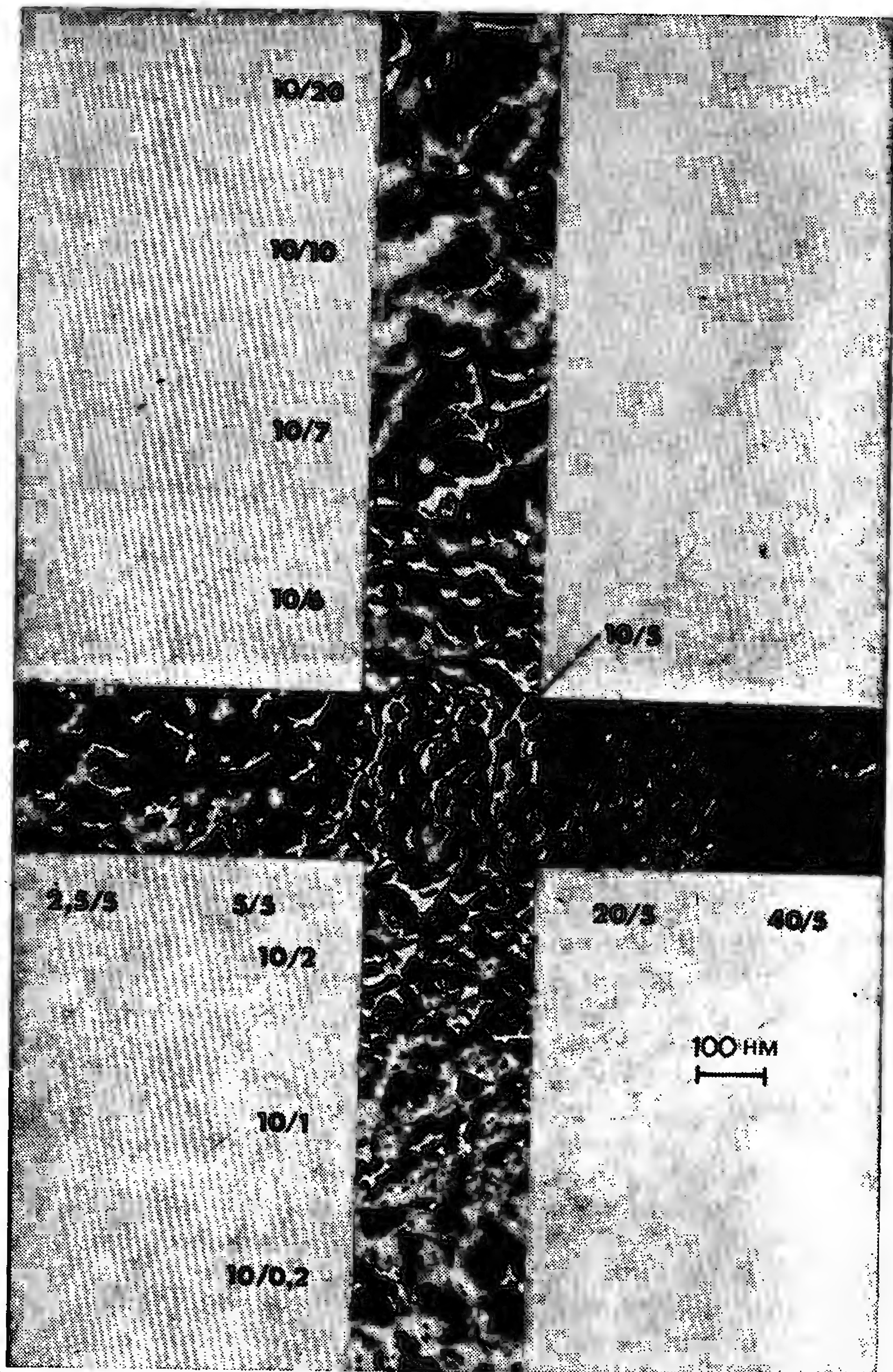


Рис. 3.6. Электронно-микроскопические фотографии полиакриламидных гелей, различающихся по суммарному содержанию мономерных компонентов (% *T*) и по относительному содержанию «сшивки» — N,N′-метиленбисакриламида (% *C*). Приведенные дроби представляют отношение параметров *T*/*C* для данных типов ПААГ. В горизонтальном ряду снимков *C* остается постоянным, а *T* увеличивается слева направо. В этой серии с ростом *T* происходит уплотнение геля и уменьшение размера пор, что согласуется с известным характером изменения молекулярно-ситовых свойств гелей. В вертикальном ряду *T* постоянно, а *C* возрастает снизу вверх. В этой серии наблюдается почти параболическая зависимость между содержанием «сшивки» и ситовым эффектом в ПААГ. (Rüchel et al., 1978.)

полиакриламидный гель представляет собой гомогенную систему в том смысле, что средняя плотность матрицы примерно постоянна по всему объему и топологические элементы в подавляющем большинстве синглетны (т. е. на две разные акриламидные цепи приходится одна сшивка). Топологические искажения (нарушения регулярности структуры), в частности петли, образующиеся в том случае, когда на две цепи приходится две сшивки, при этом крайне редки. Однако при повышении C равновесие гелеобразования постепенно смещается в сторону топологических искажений (петли и дублеты), что сопровождается двумя взаимосвязанными процессами, а именно: линейные полиакриламидные цепи становятся короче и толще, в то время как узлы (места сшивки) увеличиваются в размерах. По мере дальнейшего роста C линейные цепи постепенно исчезают, и новый набор топологических элементов теперь состоит главным образом из сгустков пространственно переплетенных петель, которые растут, формируя своего рода сферические образования или гранулы. В действительности такие «кластеры», или «агрегаты», достигают размеров, сопоставимых с длиной волны видимого света (300—700 нм), и гели этого типа становятся практически непрозрачными (мутными). Мутные гели (с высоким C) обладают следующими важнейшими свойствами: (а) нерегулярным строением, т. е. неравномерным распределением цепей по объему матрицы, которое порождает существование участков как с высокой, так и с низкой плотностью; (б) высокой пористостью; (в) меньшей эластичностью, чем в случае обычных прозрачных гелей; (г) меньшей склонностью к набуханию в растворителе. Для иллюстрации необычайно высокой эффективной пористости гелей с высоким значением C можно провести следующую аналогию. В обычных умеренно сшитых гелях макромолекулы мигрируют сквозь пространственную сетку геля через поры, образующиеся между цепями матрицы. В высокосшитых гелях (или в гелях, содержащих только продукты полимеризации «сшивки») макромолекулы могут мигрировать в свободном пространстве между гранулами или компактными агрегатами, из которых построена матрица таких гелей. Таким образом, как бы парадоксально это ни звучало, высокосшитые гели по свойствам напоминают гель-фильтрационные системы. Как показано в работе Righetti et al., 1981b, в гелях с $C=50$—60% размер пор достигает 500—600 нм, что делает такие гели особенно привлекательными для изоэлектрического фракционирования. Однако по ряду причин их практическая ценность оказывается весьма ограниченной. Во-первых, гели этого типа очень непрочны и (при $C>50\%$) абсолютно неэластичны. Это значит, что практически можно работать только с горизонтальными тонкими пластинами геля, ковалентно «пришитого» к стеклянной подложке с по-

мощью силанольных мостиков (Bianchi Bosisio et al., 1980). Во-вторых, при $C_{бис}>30\%$ гель становится гидрофобным, стремится отторгнуть воду и со временем разрушается. Наблюдаемая гидрофобность связана не только с повышенным содержанием биса, поскольку аналогичные явления наблюдаются и для гелей, основанных на использовании более гидрофильной «сшивки» — N,N'-(1,2-дигидроксиэтилен)бисакриламида (ДГЭБА). Причина скорее заключается в том, что высокая плотность «сшивки» препятствует набуханию матрицы в растворителе. По-видимому, оказывается, что контакты полимер—полимер становятся выгоднее, чем контакты полимер—растворитель. Удачным компромиссным вариантом можно считать гели с 30% $C_{бис}$ или 40% $C_{ДГЭБА}$, которые характеризуются относительно крупными порами (200—250 нм) и в то же время приемлемы с точки зрения механических свойств и склонности к набуханию.

Разнообразие полиакриламидных гелей иллюстрирует тот факт, что помимо биса в качестве «сшивки» могут быть использованы другие химические реагенты для получения гелей с определенными свойствами, продиктованными потребностями конкретной системы фракционирования. Эти реагенты перечислены в табл. 3.1. Для приготовления «обратимых» разжижаемых гелей используется ДГЭБА (O'Connel, Brady, 1976), поскольку его 1,2-диольная группировка легко подвергается окислительному расщеплению иодной кислотой. На том же принципе основано применение ДАТД (Anker, 1970). Расщеплению другого типа подвергаются гели на основе ЭДА (Paus, 1971); в этом случае «сшивка» содержит эфирную группировку, которая гидролизуется в щелочной среде (основный катализ). К той же серии эфирных производных принадлежат «сшивки» на основе поли-(этиленгликоль)-диакрилатов (Righetti et al., 1981b). Еще один вариант «сшивки», поддающейся расщеплению, — это БАЦ, содержащий дисульфидную группу, которая может быть восстановлена под действием тиолсодержащих агентов (Hansen, 1976; Hansen et al., 1980). Гели, получаемые на основе БАЦ, особенно полезны при фракционировании РНК — только эти гели легко разжижаются в мягких, почти физиологических условиях. Большинство перечисленных в таблице реагентов успешно применяются для приготовления полиакриламидных гелей, за исключением ДАТД и ТАЦТ: оба этих реагента являются аллильными производными и подавляют полимеризацию. Использовать их при высоких значениях C попросту невозможно (Gelfi, Righetti, 1981a,b; Bianchi Bosisio et al., 1980).

3.2.4. ИЭФ в тонких агарозных пластинах

Агароза, пригодная для ИЭФ, в настоящее время поставляется фирмой Marine Colloids (FMC Corp., Rockland, ME) с тор-

говым названием Isogel agarose, фирмой LKB Produkter AB— agarose EF и фирмой Pharmacia — agarose IEF. Способ получения двух первых марок агарозы держится в секрете. Про последнюю известно, что суть процесса сводится к компенсации суммарного отрицательного заряда полисахаридной матрицы (обусловленного главным образом сульфогруппами) с помощью ковалентной «посадки» на матрицу эквивалентного числа положительно заряженных групп. Подобный процесс был уже описан ранее (Grubb, 1973; Ragetli, Weintraub, 1966). Впрочем, весьма вероятно, что фирма Pharmacia для модификации агарозы использует более сильные, четвертичные аммониевые, основания, для которых значения р*K* лежат за пределами обычных рабочих диапазонов pH при ИЭФ. Рабочие характеристики агарозы марки IEF были независимо изучены в работах Rosén et al., 1979a,b; Rosén, 1980, и в работах Saravis et al., 1979, 1980a,b; Saravis, Zamcheck, 1979. Сообщалось об очень высоком разрешении при ИЭФ с использованием этой агарозной матрицы таких высокомолекулярных белков, как α_2-макроглобулин (M_r 780 000), 19 различных иммуноглобулинов М (Ig M, M_r 900 000), гемоцианина из моллюска *Fissurella* (M_r $3 \cdot 10^6$) и цинк-глицинатного маркера опухолей человека (M_r $2 \cdot 10^6$). Помимо значительно большего размера пор у агарозной матрицы есть и другие важные преимущества по сравнению с матрицами типа полиакриламида: (а) она не токсична, тогда как акриламид и бис являются нейротоксинами; (б) гелеобразование происходит без участия каких-либо катализаторов, которые (например, в случае полимеризации акриламида) образуют долгоживущие свободные радикалы; (в) агарозная матрица очень удобна для проведения иммунофиксации или иммунофореза после ИЭФ; (г) агарозные гели быстро и эффективно окрашиваются, отмываются от фона и легко могут быть высушены для хранения. (Как будет показано далее, свойства последней группы характерны и для используемых в настоящее время ультратонких полиакриламидных гелей.) Простоте приготовления и

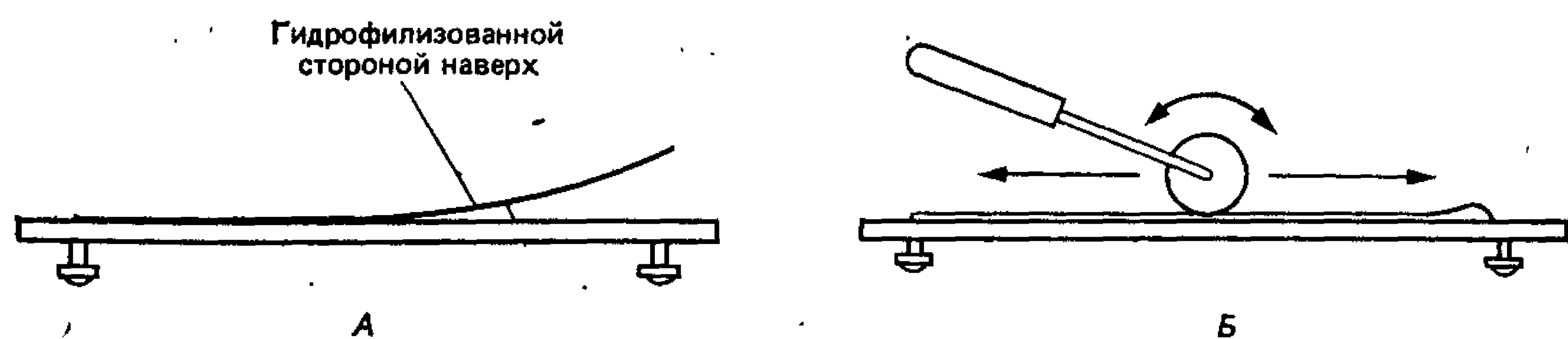


Рис. 3.7. Наложение (*А*) и накатывание (*Б*) пленки типа Gelbond на регулируемый по уровню столик для заливки агарозного геля. (С любезного разрешения фирмы Marine Colloids, из методической разработки Saravis, Cook, 1979.)

манипуляций с агарозными гелями способствует применение прозрачных гибких полиэфирных подложек (например, Gel Bond фирмы Marine Colloids), у которых одна из поверхностей гидрофилизована для улучшения сцепления с гелем. Подложки этого типа выпускаются в виде листов или рулонов с толщиной пленки 0,1 мм (гибкая) или 0,2 мм (полужесткая). С моей точки зрения, лучше покупать готовые листы, поскольку куски нужного размера, отрезанные от рулона, имеют тенденцию к скручиванию.

Для приготовления агарозного геля подложку (обычно размером 12,5×12,5 см) накладывают на выверенный по уровню горизонтальный столик, гидрофобной стороной вниз (та сторона, на которой капля воды не растекается), и при необходимости накатывают резиновым валиком для удаления пузырей воздуха (рис. 3.7*А,Б*). Для того, чтобы избежать слишком быстрого теплоотвода при контакте с металлической поверхностью столика, что могло бы привести к неравномерному застыванию геля, предлагается между столиком и подложкой проложить лист термоизолятора — пористого полистирола (из инструкции в брошюре фирмы LKB). Для ИЭФ можно использовать раствор агарозы любой концентрации в диапазоне 0,5—1,25%. Однако, ввиду того что гели с более высокой концентрацией агарозы лучше удерживают воду, оптимальной рабочей концентрацией можно считать 0,8%, при которой пористость агарозного геля еще достаточно высока (170 нм). Нужный объем раствора агарозы кипятят на водяной бане в течение 10 мин (можно кипятить и заведомо больший объем, затем разливать аликвоты по пробиркам и хранить при 4 °С, а перед употреблением расплавлять). Для предотвращения упаривания раствора колбу при кипячении следует закрывать охлаждаемым стеклянным пальцем или просто перевернутым небольшим стаканчиком (парафильм для этой цели не подходит, поскольку он плавится или рвется!). После полного растворения агарозы колбу выдерживают в водяной бане с температурой 56—58 °С, добавляют рассчитанное количество нагретого раствора амфолитов-носителей (до концентрации 2,5%) и выливают все содержимое на горизонтально установленную подложку типа Gel Bond (см. рис. 3.8,*А*). Объем рабочего раствора выбирают таким, чтобы получить гель толщиной около 1 мм. Для заливки более тонких гелей (например, 0,8 мм) лучше пользоваться вертикальной формой, которая обычно применяется для полимеризации полиакриламидных гелей (рис. 3.8,*Б*). При этом удается избежать образования неравномерного по толщине слоя (особенно у краев). На одной из внутренних поверхностей формы для заливки должна находиться подложка Gel Bond. Всю форму перед заливкой раствора агарозы следует подогреть. Готовые пластины обычно выдер-

живают в течение ночи при 4 °С для старения геля и повышения его механической прочности. Однако высказывалось мнение (Saravis et al., 1980a), что лучше выдерживать гель при комнатной температуре во избежание синерезиса («усадки» геля с вытеснением воды), который иногда наблюдается в процессе хранения геля при 4 °С. Образцы наносят или в виде капель (по 3 мкл) прямо на поверхность геля, или с помощью смоченных кусочков фильтровальной бумаги (типа Paratex, LKB 2117-103), или через прорези шаблона, изготовленного из материала типа Mylar (толщиной 52 мкм). При анализе биопсийного материала на поверхность геля можно непосредственно накладывать тканевые срезы (Saravis et al., 1979).

Фокусирование обычно продолжается 60 мин при постоянной мощности 10 Вт; к концу процесса напряжение возрастает до 1100 В (Vesterberg, 1980). Поскольку агарозная матрица все же содержит заряженные группы, что порождает ощутимый перенос жидкости к катоду, предлагалось постоянно осушать поверхность геля у катода с помощью тонкой фильтровальной бумаги (Thymann, 1980) или проводить ИЭФ при

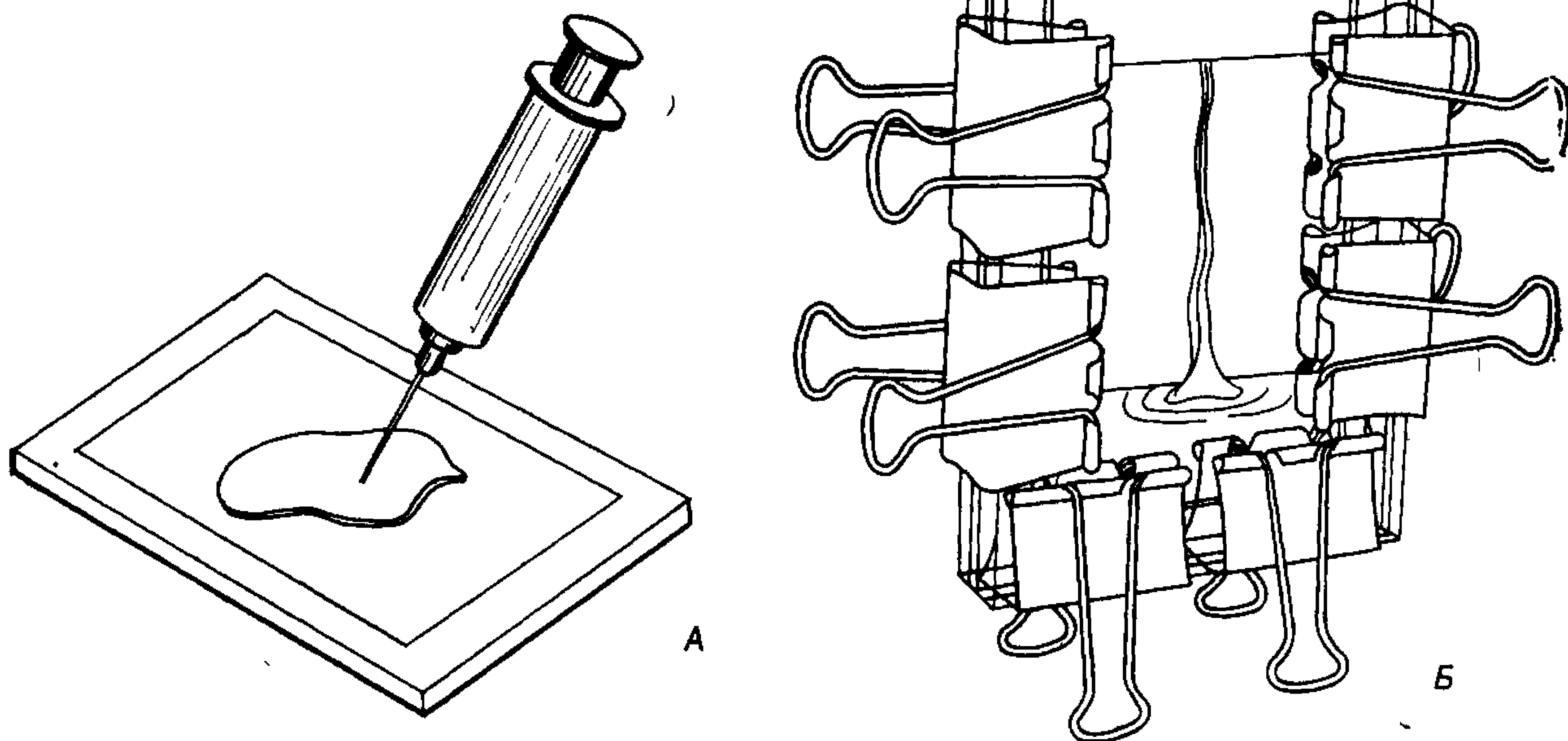


Рис. 3.8. *А*. Приготовление слоя агарозного геля толщиной 1 мм и более. Соответствующее количество раствора выливают прямо на расположенную горизонтально пленку типа Gelbond (лучше пользоваться не шприцем, а колбой Эрленмейера). *Б*. Форма для заливки агарозных гелей толщиной менее 1 мм. Форму, на одну из поверхностей которой накладывают пленку Gelbond, следует предварительно прогреть примерно до 50 °С. (Оба рисунка заимствованы из методической разработки Saravis, Cook, 1979, с любезного разрешения фирмы Marine Colloids.)

15 °C вместо 4 °C (Vesterberg, 1980). Однако, по-видимому, это относится только к первым партиям агарозы типа IEF, которые еще не были достаточно хорошо «сбалансированы». При использовании выпускаемой в настоящее время продукции остаточный катодный дрейф должен быть значительно менее ощутимым. По окончании ИЭФ гель быстро фиксируют в 5%-ном водном растворе ТХУ, содержащем 33% метанола и 3,5% сульфосалициловой кислоты. После фиксации агарозный гель на подложке высушивают, проводя последовательно операции, которые проиллюстрированы на рис. 3.9. Поверхность геля покрывают листом фильтровальной бумаги, на который кладут еще несколько слоев фильтровальной бумаги, и выдерживают такой «сэндвич» под грузом (0,5—1 кг). Затем с помощью фена полностью высушивают гель и снимают прилегающий к поверхности геля лист бумаги с помощью процедуры «быстрого смачивания» (этапы 3 и 4 на рис. 3.9). На этом этапе высушенную агарозную пленку

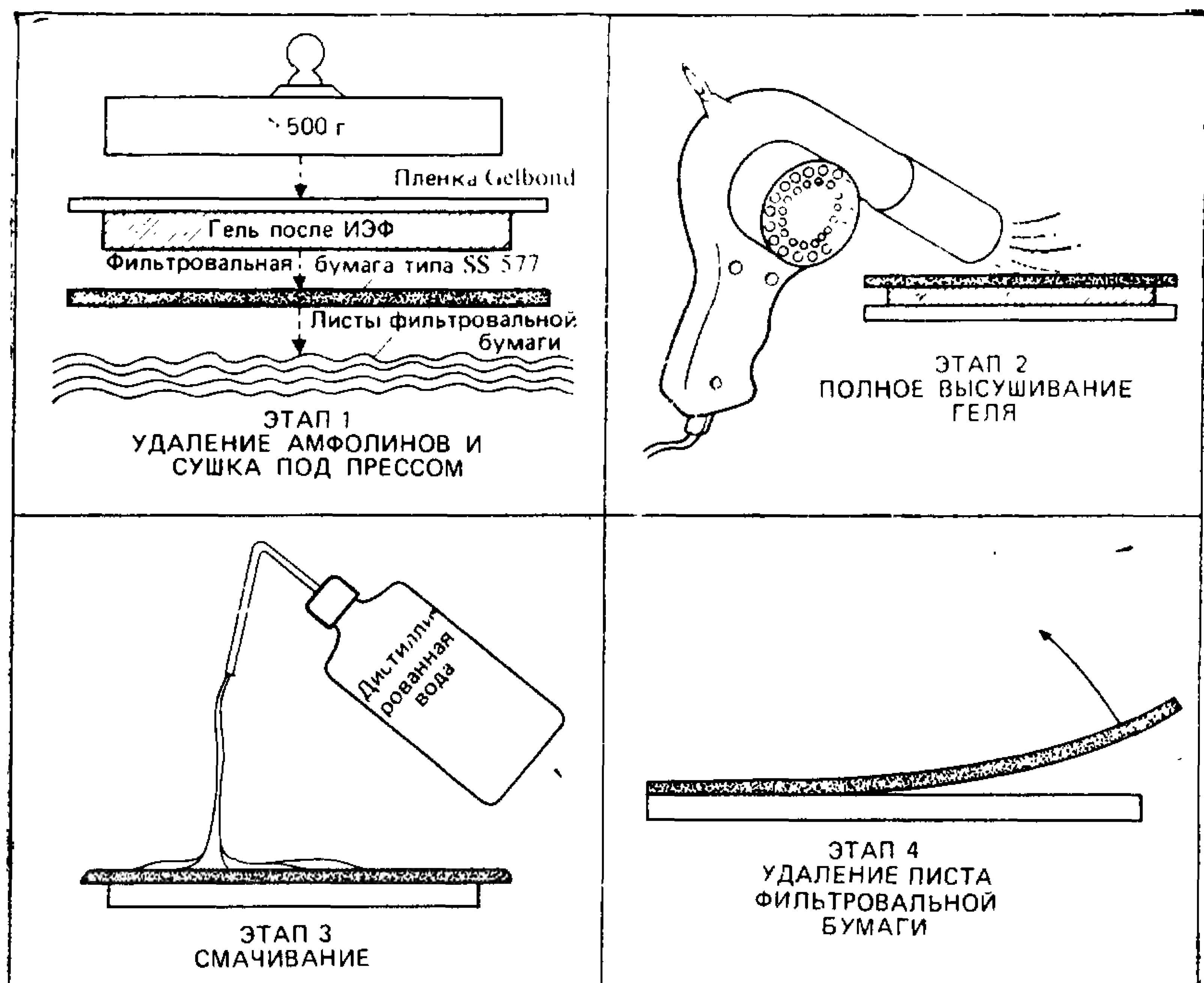


Рис. 3.9. Методика высушивания агарозного геля после ИЭФ для последующего окрашивания. После фиксации в ТХУ гель прижимают к стопке листов фильтровальной бумаги с помощью груза (0,5—1 кг/дм^2) (этап 1). Гель окончательно подсушивают феном (этап 2). Лист фильтровальной бумаги удаляют с поверхности агарозной пленки с помощью процедуры «быстрого смачивания» (этапы 3 и 4). (Из методической разработки Saravis, Cook, 1979, с любезного разрешения фирмы Marine Colloids.)

можно быстро окрасить и отмыть от фона. Можно пользоваться обычными красителями типа кумасси или, как предлагается в работе Saravis et al., 1980, применять метод, описанный Crowle, Cline, 1977 [2,5 г кроцеинового алого (Crocein Scarlet), 150 мг кумасси ярко-синего (Coomassie Brilliant Blue, CBB R-250), 50 мл ледяной уксусной кислоты и 30 г ТХУ на 1 л раствора].

При ИЭФ белков в денатурирующих и (или) восстанавливающих условиях, т. е. в присутствии 8—9 M мочевины и (или) меркаптоэтанола, было бы лучше всего использовать крупнопористую матрицу типа агарозной, поскольку в результате разворачивания белковых глобул их стоксов радиус заметно возрастает (Creighton, 1979). В то же время присутствие мочевины — типичного агента, разрывающего водородные связи, — отрицательно сказывается на свойствах агарозного геля, в структуре которого существенную роль играет именно разветвленная система водородных связей. Эту проблему удается разрешить за счет повышения концентрации агарозы в геле от 0,8, до 2%. Рабочий раствор, содержащий 2%-ную агарозу, 8 M мочевину, а также 10%-ный сорбитол, заливают в форму и выдерживают 15—20 ч при 21°C (Olsson, Lääs, 1981). Для предотвращения карбамилирования белковых аминогрупп цианат-ионами, равновесная концентрация которых в 8 M мочевине при 20°C и pH>6 достигает 20 мМ, в гель можно вводить 1%-ный меркаптоэтанол, эффективно блокирующий цианат-ионы.

Гели на основе агарозы IEF могут иметь самое разнообразное применение. Так, с помощью иммунопероксидазного метода удавалось зарегистрировать сфокусированные в агарозном геле антигены при очень высоком разбавлении антител (<1 : 2500) (Saravis et al., 1980b). При необходимости чувствительность можно повысить еще в 100 раз, используя прочность комплекса между авидином и биотином. В образовании специфического комплекса при этом участвуют биотинилированные вторичные антитела, авидин и биотинилированная пероксидаза хрена. Поскольку этот комплекс намного стабильнее, чем использовавшийся в первом случае конъюгат пероксидазы с антителами козы против мышиных иммуноглобулинов, для обнаружения сфокусированных антигенов оказывается достаточным использовать первичные антитела с разбавлением 1 : 250 000.

Агарозные гели успешно применяются и для перекрестного иммуноэлектрофокусирования. Суть данного метода заключается в том, что на первой стадии проводят обычное ИЭФ белков, а на второй — иммуноэлектрофорез в перпендикулярном направлении в содержащем антитела агарозном геле. Ранее, когда первую стадию приходилось проводить в полиакриламидном

геле, для осуществления второй стадии полоску ПААГ после ИЭФ просто накладывали на агарозную пластинку с антителами (Söderholm et al., 1975). Сейчас, когда стало возможным проводить ИЭФ в агарозе, полоску агарозы после фокусирования можно вплавить в агарозную пластину второго направления, что позволяет получать более воспроизводимые результаты. Наконец, ИЭФ в агарозе может быть использовано в сочетании с ДДС-Na-электрофорезом во втором направлении для получения pI/M_r-белковых карт, аналогично классическому методу O'Farrell, 1975. В этом случае применение агарозного геля на первой стадии позволяет надеяться на то, что при ИЭФ даже очень крупные белки смогут достигнуть своих равновесных положений (pI). Это в свою очередь должно повысить воспроизводимость метода.

3.2.5. ИЭФ на ацетилцеллюлозных пленках

Использовать ацетилцеллюлозу в качестве матрицы для зонального электрофореза впервые предложил Кон (Kohn, 1957). Этот метод, одно время называвшийся просто электрофорезом по Кону, стал весьма популярен. Для ацетилцеллюлозы совершенно несвойственны молекулярно-ситовые эффекты, поэтому она могла бы служить идеальной матрицей и для ИЭФ. Тем не менее содержание карбоксильных групп у поступавших в продажу пленок было настолько велико, что ни о каком ИЭФ не могло быть и речи. Из-за крайне низкой ионной силы в растворе сфокусированных амфолитов и без того значительный электроэндосмотический поток жидкости в пленке становился еще сильнее. Применение для ИЭФ ацетилцеллюлозных мембран, обработанных поверхностно-активным агентом Separax-EF (поставляется компанией Fuji Photo, Tokyo, Japan), было впервые описано в работах Harada, 1975, и Harada et al., 1980. Этот способ не получил широкого признания, возможно, из-за все же значительного остаточного электроэндосмоса.

Позднее была описана методика исчерпывающего метилирования ацетилцеллюлозных пленок, позволяющая получать матрицу, пригодную для ИЭФ (Ambler, 1978a,b). И в этом случае ввиду неполного устранения эндосмоса приходится проводить ИЭФ при концентрации амфолинов 8% (вместо обычных 2% при работе с полиакриламидными гелями) и в присутствии 10%-ного глицерина. При фокусировании в узком диапазоне pH в качестве католита и анолита следует использовать слабые основания и кислоты, например 0,2 М лизин и 0,2 М уксусную кислоту. Данную методику метилирования (с помощью BF_3 в метаноле) можно использовать только для обработки гелеобразных ацетилцеллюлозных мембран (типа Cellogel). Она не

подходит для метилирования «сухих» мембран, таких, как Sepraphore III (производства фирмы Gelman, Ann Arbor, MI, USA). Впоследствии была описана методика, пригодная и для обработки мембран последнего типа, основанная на применении серии водных растворов с постепенно возрастающим содержанием метанола (Ambler, Walker, 1979). И все же (по моему опыту работы с ацетилцеллюлозными пленками) процесс ИЭФ в них нестабилен и с трудом поддается контролю. Предстоит еще немало работы по улучшению свойств самой матрицы и по стандартизации условий ИЭФ в ней. Для развития этого метода было бы крайне целесообразно, чтобы фирмы наладили производство и продажу тщательно обработанных стандартных ацетилцеллюлозных пленок для ИЭФ. На сегодняшний день в литературе описано ИЭФ на мембранах типа Iso Sepraphore фирмы Gelman (Janik, Dane, 1981). Среди ограниченного числа публикаций по применению этих мембран можно отметить работу Boussios, Bertles, 1978, по изоэлектрическому фракционированию цепей глобулина человека на мембранах, импрегнированных 5 М мочевиной и 5%-ным β-меркаптоэтанолом. Полученные авторами хорошие результаты, вероятно, связаны с применением мочевины, которая, как отмечалось (Gianazza et al., 1979), стабилизирует градиент pH за счет эффективного подавления катодного дрейфа.

3.2.6. ИЭФ в тонком слое гранулированного геля

В этом разделе речь пойдет об аналитическом варианте метода Радолы, который уже обсуждался в разд. 2.2.3. Гранулированные гели обладают некоторыми преимуществами по сравнению с обычным полиакриламидным гелем. При работе с гранулированным гелем можно не опасаться возникновения артефактов, которые, как известно, иногда проявляются в обычных полимерных гелях из-за присутствия в них катализаторов полимеризации (разд. 3.2.9). В гранулированном геле пористость не является лимитирующим фактором, т. е. стерические затруднения не возникают даже при фокусировании очень крупных молекул.

По методологии аналитическое ИЭФ в слое гранулированного геля мало чем отличается от препаративного варианта (см. разд. 2.2.3). В опыте используют стеклянные подложки различных размеров (обычно 20×10, 20×20 или 40×20 см), на которые наносят слой сефадекса G-75 («суперфайн») толщиной 0,6—1,0 мм для аналитического или толщиной 2 мм — для полупрепаративного разделения. Нанесенный влажный слой геля, содержащего амфолины в концентрации 1%, высушивают на воздухе до такой консистенции, при которой он перестает

«сползать» при наклоне пластины под углом 45°. Это соответствует потере около 25% всей воды, содержащейся в исходной суспензии геля. Образец, как правило, наносят в середину слоя или ближе к аноду в виде смоченной анализируемым раствором полоски фильтровальной бумаги или непосредственно на поверхность геля в виде капли или полосы раствора. Готовую пластину помещают на поверхность блока охлаждения прибора типа «двойной камеры» производства фирмы Desaga. Электрическое поле прикладывают через плоские угольные электроды, которые прижимают к полоскам толстой фильтровальной бумаги (типа MN 866 с поверхностной плотностью 650 г/м^2, производства западногерманской фирмы Machery, Nagel and Co., Duren, West Germany), смоченным 1 М серной кислотой (анод) и 2 М этилендиамином (катод) (Radola, 1969, 1973a,b, 1975). После ИЭФ белковые зоны регистрируют методом реплики на листе фильтровальной бумаги (типа MN 827, поверхностная плотность 270 г/м^2; Machery, Nagel and Co.), который аккуратно накладывают на поверхность слоя. Для окраски реплики пользуются одним из следующих красителей: Light Green SF, Coomassie Brilliant Blue R-250, Coomassie Violet R-150 или Coomassie Brilliant Blue G-250.

В одном из вариантов метода в исходную суспензию сефадекса добавляют также акриламид и сшивающий агент (Ziegler, Köhler, 1976). После ИЭФ в таком слое проводят его полимеризацию, опрыскивая концентрированным буферным раствором, содержащим соответствующие катализаторы. Преимущества этого метода заключаются, с одной стороны, в устранении стерических препятствий при фокусировании очень крупных молекул, а с другой — в облегчении процедуры регистрации зон в полимерном геле. Впрочем, существует опасность, что в процессе ИЭФ, особенно в щелочной области, белки будут реагировать с акриламидными мономерами.

Помимо сефадекса для ИЭФ могут быть использованы и другие гранулированные гели, например на основе полиакриламида (биогель Р) и даже пластика (Pevikon C-870; Harpel, Kueppers, 1980). В последнем варианте пластиковые гранулы приходится смешивать с каким-либо гидрофильным полимером, поскольку сами они не связывают воду. При работе со слоем из чистого пластика недопустимо высоким оказалось бы электрическое сопротивление слоя.

3.2.7. ИЭФ в полиакриламидных гелях

Сообщения о разработке нового аналитического варианта ИЭФ в полиакриламидном геле и о его преимуществах по сравнению с жидкостным ИЭФ появились независимо и практиче-

ски одновременно в целом ряде публикаций (Awdeh et al., 1968; Dale, Latner, 1968; Fawcett, 1968; Leaback, Rutter, 1968; Riley, Coleman, 1968; Wrigley, 1968a,b; Catsimpoolas, 1969a). Эти работы сразу же продемонстрировали уникальные возможности нового метода. Однако в тот период, когда совершался переход от жидкостного ИЭФ к ИЭФ в геле, практически не было проведено систематических исследований по оптимизации таких факторов, как состав геля и электрические условия ИЭФ. Почти все первые системы ИЭФ в геле, особенно основанные на использовании трубок, отличались нестабильностью градиента pH («катодный дрейф» по Righetti, Drysdale, 1971, или «эффект плато» — по Finlayson, Chrambach, 1971), что заметно ограничивало их применимость. Можно сказать, что на первых этапах существования ИЭФ в геле едва ли кому-нибудь удавалось добиться получения истинно стационарных условий и достаточно стабильного градиента pH, в котором макромолекулы могли бы сфокусироваться при истинных значениях своих pI. На сегодняшний день развитие метода шагнуло достаточно далеко, чтобы в большинстве случаев обеспечить получение стабильных белковых зон, достигающих равновесного положения (pI) задолго до начала заметной дестабилизации градиента pH. Более того, с появлением революционного метода, основанного на использовании иммобилизованных (или «пришитых») градиентов pH (разд, 1.11.7), проблема «катодного дрейфа» полностью снимается. Иммобилизованные градиенты pH практически абсолютно стабильны, и миграции белковых зон от своих значений pI не наблюдается. Исходя из отмеченных факторов, а также из общеизвестной универсальности полиакриламидных гелей (которые можно приготовить как с узкими, так и с широкими порами, в виде цилиндрических столбиков, пластин или ультратонких слоев, а также при необходимости легко подвергать разжижению по окончании фракционирования), можно сказать, что возможности этих гелей далеко не исчерпаны. Не приходится сомневаться, что они и в дальнейшем будут широко использоваться в большинстве вариантов метода изоэлектрического фракционирования.

3.2.8. Состав геля

Выбор геля соответствующего состава — это один из ключевых моментов метода ИЭФ в ПААГ. Особое значение имеют два параметра — пористость и концентрация амфолитов в геле. Желательно использовать гели с максимальной пористостью и вместе с тем обладающие достаточной механической прочностью. Оба этих свойства зависят от относительного содержания акри-

ламида и «сшивки», которое обычно выражают с помощью следующих параметров (Hjertén, 1962):

$$T(\%) = \frac{(\text{акриламид} + \text{сшивка})\ \text{г}}{100\ \text{мл раствора}}$$

$$C(\%) = \frac{(\text{сшивка})\ \text{г}}{(\text{акриламид} + \text{сшивка})\ \text{г}} \cdot 100$$

Минимальное содержание акриламида, при котором образуется гель, пригодный для ИЭФ, соответствует значениям параметров $T=3\%$, $C=4\%$ (бис). Однако гели с таким составом отличаются чрезвычайной мягкостью и липкостью. В большинстве случаев удовлетворительные результаты удается получить при ИЭФ в гелях состава $T=5\%$, $C=3\%$ (Vesterberg, 1971b) и $T=4\%$, $C=4\%$ (Righetti, Drysdale, 1971). В таких гелях можно проводить ИЭФ белков с мол. массой вплоть до $1{,}5 \cdot 10^6$, хотя для наиболее крупных белков (в пределах этого диапазона) приходится заметно увеличивать время фокусирования. Белки с $M_r < 100\,000$ фокусируются достаточно быстро. Эти гели также не очень прочны и требуют весьма осторожного обращения. Поскольку мол. масса большинства известных белков в действительности не превышает 200 000, часто можно пользоваться более прочными гелями с $T=5\%$ и $C=4\%$. С гелями такого, по сути дела, оптимального состава легко манипулировать при окрашивании и сканировании.

Другое важное требование при ИЭФ в ПААГ заключается в необходимости получения градиента pH, достаточно стабильного для того, чтобы все белки могли достичь своих равновесных положений, преодолев сопротивление матрицы. Поскольку положение сфокусированного белка, естественно, зависит от формы конкретного профиля pH, очень важно добиться получения воспроизводимых градиентов pH в геле. При работе с нестабильными и невоспроизводимыми градиентами весьма непросто сопоставлять картины разделения, полученные в различных опытах или с различными партиями номинально одинаковых препаратов амфолитов-носителей.

Мы установили, что для получения стабильного градиента pH при ИЭФ в ПААГ концентрация амфолитов-носителей в геле должна быть не ниже 2%. При более низких концентрациях (особенно при концентрациях ниже 1%) градиент pH в геле, как правило, нестабилен (Finlayson, Chrambach, 1971; Righetti, Drysdale, 1971). В таких гелях часто возникают локальные перегревы. По-видимому, общее содержание амфолитов-носителей должно быть не ниже определенного уровня, при котором все соседние зоны сфокусированных амфолитов перекрываются настолько, чтобы обеспечить достаточно хорошую электропроводность по всему градиенту pH. Концентрация амфолитов также

должна быть достаточной и для того, чтобы перекрыть буферную емкость белков, сконцентрированных в пределах своих зон фокусирования. Желательно, чтобы удельная буферная емкость амфолитов при pH вблизи pI была не ниже 0,3 мкэкв/мг (Vesterberg, 1973c). Помимо всего прочего, следует обратить особое внимание на те случаи, когда область pH около 7 не входит в рабочий диапазон pH разделения. При этом сам рабочий раствор не содержит амфолитов, обладающих буферными свойствами при pH 7, однако участок с pH 7 с неизбежностью должен появиться возле одного из электродов. Для того чтобы избежать чрезмерного падения напряжения на таком участке и, следовательно, «недофокусирования» на других участках градиента, в гель дополнительно вводят небольшое количество амфолитов диапазона pH 3—10 или 6—8 (Haglund, 1971).

3.2.9. Полимеризация геля

В этом разделе будут рассмотрены общие аспекты процесса полимеризации, относящиеся к приготовлению как плоских, так и цилиндрических гелей. Более подробная информация по кинетике полимеризации в зависимости от применения различных типов сшивающих агентов, катализаторов и температуры содержится в публикациях Gelfi, Righetti, 1981a,b, и Righetti et al., 1981c.

Для приготовления ПААГ используются следующие реактивы: перекристаллизованный акриламид и бис (или «сшивка» любого другого типа, за исключением ДАТД), N,N,N′,N′-тетраметилэтилендиамин (ТЕМЭД), персульфат аммония (или калия), рибофлавин или рибофлавин-5-фосфат (флавинмононуклеотид — ФМН), амфолиты-носители и при необходимости такие добавки, как сахароза, сорбитол, глицерин, мочевина, нейтральные или цвиттерионные детергенты. Для полимеризации готовят следующие исходные растворы:

Раствор мономеров	28,8 г акриламида и 1,2 г бис на 100 мл раствора в дистиллированной воде (T=30%, C=40%)
Амфолиты-носители	40%-ные растворы (за исключением амфолитов pH 2,5—4 и 9—11 с концентрацией 20%)
ТЕМЭД	10%-ный водный раствор
Персульфат аммония	40%-ный водный раствор (готовят заново каждую неделю)
Рибофлавин (или ФМН)	4 мг/100 мл воды

Следует помнить, что акриламид в мономерной форме является нейротоксином, поэтому работать с ним следует, не допу-

ская попадания его на кожу. Как правило, нет необходимости независимо готовить растворы, содержащие отдельно акриламид и отдельно бис, за исключением тех случаев, когда применяют гели с очень высоким содержанием «сшивки». Растворы акриламида и рибофлавина портятся на свету, поэтому их следует хранить в посуде, обернутой алюминиевой фольгой (просто темное стекло не обладает достаточным защитным действием) при 4 °C. Нежелательно хранить исходный раствор мономеров дольше одного месяца, поскольку акриламид в растворе медленно гидролизуется с образованием свободной акриловой кислоты.

Последовательность операций 1. Заливают нужный объем раствора, содержащего мономеры (обычно 5—6% T и 4% $C_{бис}$ или 4% $C_{БАЦ}$ или 4% $C_{ДГЭБА}$) и амфолиты-носители (обычно 2%), в коническую колбу с боковым отростком (колбу Бунзена).

2. Закрывают колбу и тщательно деаэрируют раствор, подсоединив на 5 мин к водоструйному или масляному вакуумному насосу. Для лучшей воспроизводимости я предпочитаю пользоваться масляным насосом, обеспечивающим вакуум около 0,1 мм ртутного столба, а также присоединять колбу через трехходовой кран к баллону с азотом. Тогда после деаэрации содержимое колбы вновь заполняется не воздухом, а азотом. Для более эффективного удаления кислорода содержимое колбы в процессе откачивания следует слегка подогревать и, уж во всяком случае, не охлаждать.

3. Добавляют 5 мкл и 1 мкл растворов ТЕМЭД и персульфата аммония (в расчете на 1 мл раствора мономеров и именно в такой последовательности) и быстро перемешивают.

4. Сразу же заливают раствор в собранную плоскую форму или разливают по трубкам. В форму жидкость наливают до переполнения, а в трубках оставляют 0,5—1 см до верхней кромки, с тем чтобы наслоить сверху разбавленный раствор катализаторов для предотвращения образования мениска и обеспечения равномерной полимеризации геля.

5. Полимеризация должна проходить при комнатной температуре и занимать не более 30 мин. За это время гели с обычным уровнем сшивки (2—5% C) полимеризуются не менее чем на 95%. В случае высокосшитых гелей (>10% C) может потребоваться полимеризация в течение ночи. При необходимости гели можно термостатировать при 40—50 °C, что заметно ускоряет процесс полимеризации. При тщательной герметизации готовые гели можно хранить несколько недель.

Замечания. 1. Все реактивы, использующиеся для приготовления геля, должны быть самой высокой степени очистки. В частности, акриламид следует перекристаллизовать для удаления следов свободной акриловой кислоты, которая, как правило,

присутствует в любых фирменных препаратах акриламида. Примесь акриловой кислоты влечет за собой появление на матрице иммобилизованных отрицательных зарядов, что приводит к электроэндосмосу и нестабильности градиента pH. Перекристаллизацию акриламида можно проводить из хлороформа, а биса— из ацетона (по Loening, 1967). Некоторые фирмы (в частности, Bio Rad, BDH, LKB и Polysciences) выпускают очищенные препараты акриламида вполне удовлетворительного качества. Следует также помнить, что непрореагировавшие мономеры могут связываться с амино- и сульфгидрильными группами, а также с фенольными гидроксилами (белков), особенно в сильно щелочной среде. При pH 9 реакции этого типа идут медленно, а при pH 11 — довольно быстро (за времена порядка 30 мин) (Dirksen, Chrambach, 1972).

2. В качестве инициатора полимеризации можно использовать и рибофлавин или ФМН при конечной концентрации 656 мкМ. Растворы помещают на расстоянии 10 см от лампы дневного света (типа Philips TL 20 W/SS) и проводят полимеризацию при комнатной температуре не менее 8 ч. Считается, что за 1 ч превращение мономеров протекает не более чем на 60% (Brackenridge, Bachelard, 1969), поэтому гели, полимеризовавшиеся только в течение 1 часа, как правило, липкие и мягкие (так же как и гели, «сшитые» с помощью ДАТД).

3. Пористость и механическую прочность гелей можно регулировать, изменяя объемное соотношение раствора мономеров и воды, взятых для приготовления рабочей смеси для заливки геля.

4. Дополнительные компоненты типа сахарозы, мочевины и неионных детергентов можно добавить на 1-й стадии.

5. Добавление ТЕМЭД не обязательно, поскольку сами амфолиты-носители могут выполнять аналогичную каталитическую роль при полимеризации (Riley, Coleman, 1968).

6. На ход полимеризации и физические свойства полиакриламидных гелей оказывает влияние целый ряд факторов (см. Rodbard, Chrambach, 1971; Chrambach, Rodbard, 1972). Это означает, что весь процесс должен быть предельно стандартизован. Особое внимание следует обратить на (1) чистоту реагентов, (2) условия деаэрации, (3) количественный и качественный состав набора инициаторов полимеризации, (4) температуру, (5) продолжительность полимеризации. По-видимому, наиболее вероятным источником артефактов является используемое количество персульфата. Его препараты могут заметно различаться по активности, и необходимое количество приходится подбирать методом проб и ошибок. Следует брать минимум этого реагента, обеспечивающий нормальное гелеобразование, поскольку персульфат может окислять амфолиты-носители и вы-

зывать небольшие изменения в градиенте pH. При избытке персульфата в среде образуются в заметном количестве реакционноспособные свободные радикалы (Brewer, 1967; Fantes, Furminger, 1967; Mitchell, 1967), и, если их не удалить до внесения препарата, они могут послужить источником артефактов (например, вызывать окисление цистеина до цистеиновой кислоты). Впрочем, по данным Dirksen, Chrambach, 1972, рибофлавин тоже способен вызывать окисление тиоловых групп. Похоже, что свободные радикалы остаются в геле даже после продолжительного электролиза (Peterson, 1971). И только с помощью предварительного электрофореза в присутствии тиогликолята, вводимого в гель в количествах, эквивалентных исходному количеству инициатора полимеризации (1—5 мМ), удается добиться того, чтобы условия в геле были неокисляющими (Dirksen, Chrambach, 1972).

7. При выборе амфолинов определенных диапазонов pH следует учитывать, что с их помощью не всегда можно получить строго линейный градиент pH с равномерным распределением напряжения по всему указанному рабочему диапазону (Vesterberg, 1975). Соответственно иногда есть смысл усилить определенные участки градиента с помощью амфолитов узкого диапазона pH. Так, в работе Vesterberg, 1973c, рекомендуется к амфолинам широкого диапазона pH 3,5—10 добавлять немного амфолинов pH 9—11 для поддержания линейности в щелочной области градиента. В этой же работе предлагается дополнительно вводить добавки амфолинов pH 4—6 и 5—7 для более равномерного распределения падения напряжения. Можно также специально трансформировать линейный градиент, делая определенные его участки более пологими, за счет добавок амфолинов узких диапазонов pH. Это позволяет повысить разрешение в области фокусирования особенно интересных для исследователя компонентов, сохраняя полную картину распределения других компонентов в прежнем виде.

3.2.10. Выбор электродных растворов

В качестве анолита и католита обычно используют растворы нелетучих свободных кислот и оснований соответственно. При ИЭФ в пластинах геля рекомендуется, как правило, применять более концентрированные электродные растворы по сравнению с теми, что обычно используют при ИЭФ в трубках. Это связано с тем, что в аппаратах для ИЭФ в горизонтальных пластинах в роли электродных камер выступают просто две полоски толстой фильтровальной бумаги, пропитанные анолитом и католитом. В большинстве случаев в качестве соответствующих электродных растворов подходят 1 М фосфорная кислота и 1 М

гидроксид натрия. Фирма Bio Rad в своем техническом бюллетене № 1030 (1975 г.) в качестве католита рекомендует раствор, содержащий смесь NaOH и $Ca(OH)_2$. Присутствие $Ca(OH)_2$, образующего нерастворимый $CaCO_3$, предотвращает попадание в гель карбонат-ионов, которые образуются в щелочной среде из растворенного CO_2. Хотя растворы сильных кислот и оснований могут с успехом использоваться в качестве электролитов при ИЭФ в различных диапазонах pH, часто лучших результатов удается достичь, применяя электролиты другого типа, в частности амфолиты граничных диапазонов pH. Так, в работе Vesterberg, 1975, для получения максимально пологого градиента pH в геле, содержавшем амфолины pH 5—7, в качестве анолита и католита использовались 1%-ные амфолины диапазонов pH 4—6 и 6—8 соответственно. В табл. 3.2 перечислены электродные растворы, рекомендуемые фирмами LKB, Pharmacia и Bio Rad. Из таблицы видно, что для случая ИЭФ в широком диапазоне pH 3—10 все фирмы рекомендуют сильные основания и сильные кислоты, а для ИЭФ в узких диапазонах — более слабые электролиты или смеси амфолитов-носителей. При фокусировании в трубках с ПААГ электролиты следует разбав-

Таблица 3.2. Электродные растворы для ИЭФ в пластинах геля

Диапазон pH	Анод (+)	Катод (—)
LKB		
3,5—9,5	1 M H_3PO_4	1 M NaOH
2,5—6	1 M H_3PO_4	0,5%-ные амфолины pH 5—7
5—8,5	(0,1—1,0) M H_3PO_4 или 1%-ные амфолины pH 5—7	(0,1—1) M NaOH или 10%-ные амфолины pH 8—10
7,5—10,5	0,1%-ные амфолины pH 7—9	1 M NaOH
Pharmacia		
3—10	40 мМ аспарагиновая кислота	1 M NaOH
2,5—5	0,1 M H_2SO_4	0,2 M гистидин или 0,1 M NaOH
4—6,5	40 мМ глутаминовая кислота	0,2 M гистидин
5—8	40 мМ глутаминовая кислота	1 M NaOH
6,5—9	0,25 M HEPES[1]	1 M NaOH
8—10,5	0,25 M HEPES	1 M NaOH
Bio Rad		
3—10	1 N H_3PO_4	1 M NaOH
2,9—5,0	1 N H_3PO_4	2%-ные биолиты pH 6—8
3,7—6,2	1 N H_3PO_4	1 M NaOH
4,4—7,2	1 N H_3PO_4	1 M NaOH
5,6—8,2	2%-ные биолиты pH 4—6	1 M NaOH
7,3—9,5	1 N HEPES	1 M NaOH
8,2—10,0	1 N HEPES	1 M NaOH

[1] HEPES — N-2-гидроксиэтилпиперазин-N′-2-этансульфокислота.

лять до концентрации не выше 0,1 М, т. е. ровно настолько, чтобы сохранить достаточно высокую электропроводность и избежать значительного падения напряжения на участке между электродами и гелем. В литературе имеется одно сообщение об использовании аммонийного буфера с pH 10 в качестве католита и ацетатного буфера с pH 4 в качестве анолита (Swanson, Sanders, 1975), но мне кажется, что такой подход противоречит принципу изоэлектрического фракционирования.

При ИЭФ в горизонтальных пластинах электродные полоски следует смочить соответствующими растворами и лишь затем помещать их на поверхность геля. Следует обратить внимание на равномерность смачивания. Удобный и эффективный прием заключается в том, что полоски кладут на стекло и при помощи пипетки вводят определенный объем электролита между стеклом и полоской. Это гарантирует равномерное смачивание и удаление пузырей воздуха из полоски. Смоченную полоску следует промокнуть фильтровальной бумагой для удаления избытка жидкости. Полоска должна быть с виду почти сухой, так как избыток католита или анолита может привести к образованию «затеков» на поверхности геля и к заметным искажениям градиента pH.

3.2.11. ИЭФ в пластинах ПААГ

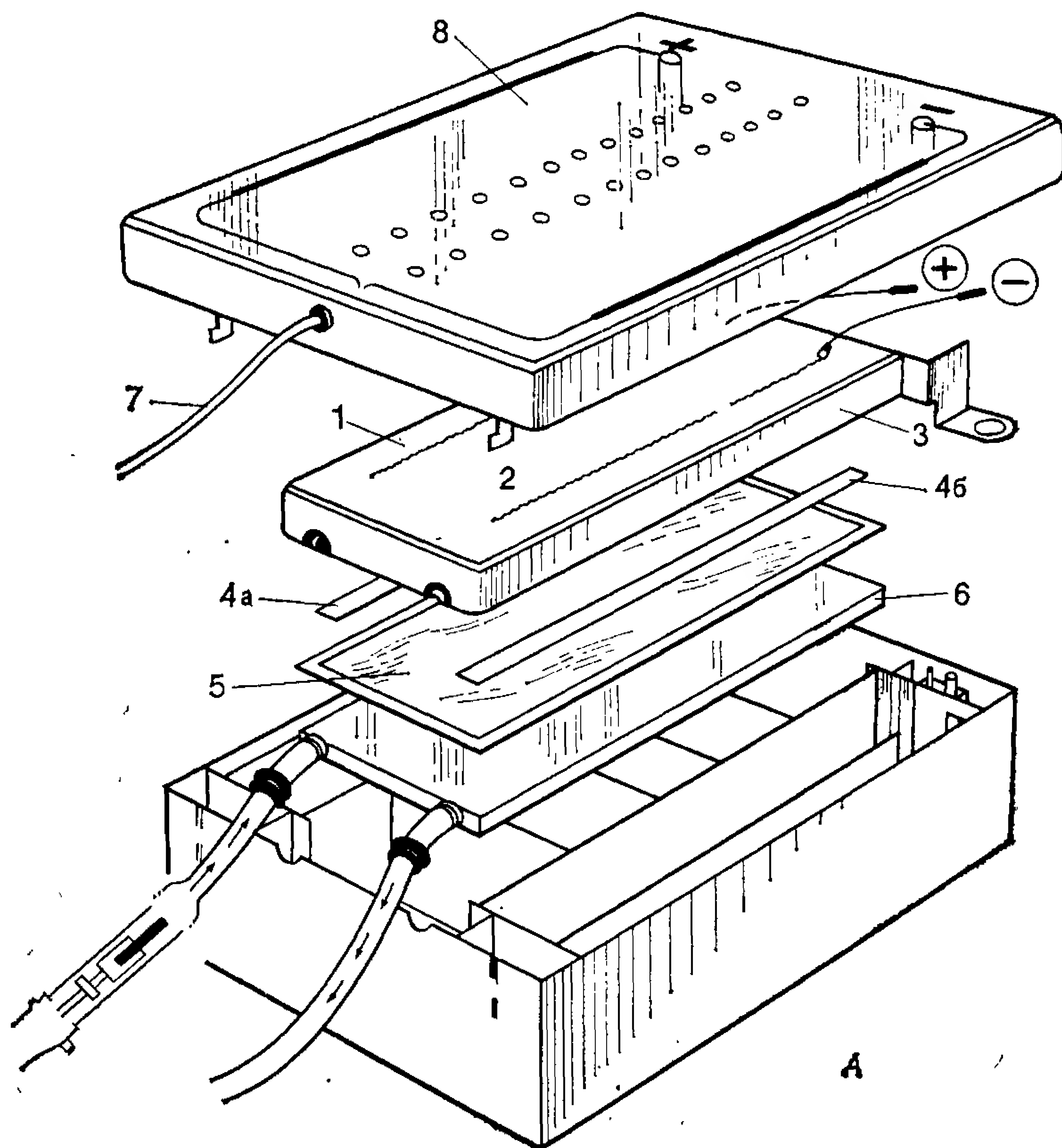
В этом разделе будут рассмотрены методические основы и приборное оснащение ИЭФ в тонких горизонтальных пластинах геля. (Более животрепещущая тема — это, конечно же, ИЭФ в ультратонких пластинах геля, поэтому нетерпеливый читатель может обратиться сразу же к разд. 3.2.13.) ИЭФ в пластинах ПААГ отличается целым рядом достоинств. По-видимому, самое главное — это исключительное удобство и наглядность сопоставления при проведении анализа многочисленных образцов в параллельных треках одного и того же геля вместо множества отдельных трубок. Вероятность повреждения образца за счет контакта с электролитами (опасность, которая есть всегда при работе с трубками) в случае ИЭФ в горизонтальных пластинах оказывается очень малой, поскольку образец можно нанести в любой точке на поверхность геля. Кроме того, при работе с пластинами упрощаются многие операции, связанные с регистрацией зон, такие, как обычное окрашивание, радиоавтография, иммунофиксация и получение реплик (например, для метода зимограмм; см. далее). Вероятность возникновения оптических артефактов при фотографировании и сканировании для плоских гелей значительно ниже, чем для цилиндрических гелей. Пластины легко высушить на подложке, после чего они становятся весьма удобными в об-

ращении и для хранения. Наконец, плоские гели легче термостатировать и в них поддерживается более стабильный градиент pH. Может быть, единственное преимущество ИЭФ в цилиндрических гелях по сравнению с ИЭФ в горизонтальных пластинах заключается в возможности фракционирования чувствительных к кислороду ферментов в строго анаэробных условиях.

На сегодняшний день многие фирмы выпускают аппараты, которые можно использовать для ИЭФ в пластинах ПААГ с вертикальным и горизонтальным расположением геля и охлаждающих поверхностей. Я предпочитаю горизонтальные системы, поскольку в них гель не столь подвержен механическому напряжению. Для горизонтальных пластин проще осуществляется установка электродов и больше возможных вариантов внесения образца. Толщина гелей обычно не превышает 1—2 мм; разделение можно проводить как вдоль, так и поперек пластины. Отвод тепла, как правило, осуществляется только через нижнюю поверхность, и электроды можно накладывать прямо на поверхность геля. Для минимизации испарения жидкости с поверхности геля его прикрывают специальной, близко прилегающей крышкой. Конструкция типичного аппарата для разделения в плоском слое показана на рис. 3.10,*А* (LKB, Multiphor 2117). Эта модель явилась прототипом большинства других функционально аналогичных систем. Среди таких систем можно назвать «двойную камеру» фирмы Desaga, систему для работы в плоском слое (FBE 3000) фирмы Pharmacia и камеры фирмы Bio Rad, модели 1405 и 1415. Система, предлагаемая фирмой Pharmacia, имеет следующие конструктивные особенности: (а) винтовые ножки для регулирования уровня, (б) широкий (25×25 см) алюминиевый охлаждающий столик с тефлоновым покрытием, (в) подвижные электроды, позволяющие как угодно варьировать размеры геля. Фирма Bio Rad выпускает две камеры разного размера: модель 1405 с охлаждаемой рабочей поверхностью 12,5×22 см и модель 1415 с охлаждаемой поверхностью 12,5×43 см. Интересная особенность этих моделей заключается в том, что в верхнюю крышку вмонтирована охлаждаемая спираль, немного выходящая за пределы поверхности геля. Испаряющаяся жидкость конденсируется на этой спирали, что предохраняет поверхность геля от запотевания. Все эти аппараты содержат дополнительно боковые электродные камеры, благодаря которым их можно использовать и для других электрофоретических методов, таких, как иммунофорез или электрофорез в ДДС-Na (см. также Righetti et al., 1980). Этим объясняется происхождение названия Multiphor — многоцелевой прибор для электрофоретических методов анализа. В настоящее время фирма LKB предлагает еще одну модель — Ultrophor 2217, очень компактную неглубокую камеру, предназ-

наченную только для ИЭФ и оснащенную подвижными электродами и очень плотно пригнанной крышкой (рис. 3.10,*Б*).

Дадим теперь некоторые практические рекомендации по использованию типичной системы ИЭФ в горизонтальных пластинах геля. Так же как и для ИЭФ в трубках, при работе с аппаратами различной конструкции возможны незначительные методические вариации. Точная последовательность операций, как правило, подробно излагается в инструкциях к соответствующим аппаратам. Я не стану приводить здесь каких-либо конкретных прописей для полимеризации гелей, поскольку они могут заметно варьировать в зависимости от экспериментальной задачи. Общие указания по этому вопросу приведены в разд. 3.2.8 и 3.2.9. Для большинства горизонтальных систем гель полимеризуют между двумя стеклянными пластинами. Одна из пластин может быть и пластиковой, например если на поверхности геля требуется сделать стандартные углубления для внесения образца. Толщина зазора между пластинами, которые разделены специальной уплотнительной резинкой или пластико-



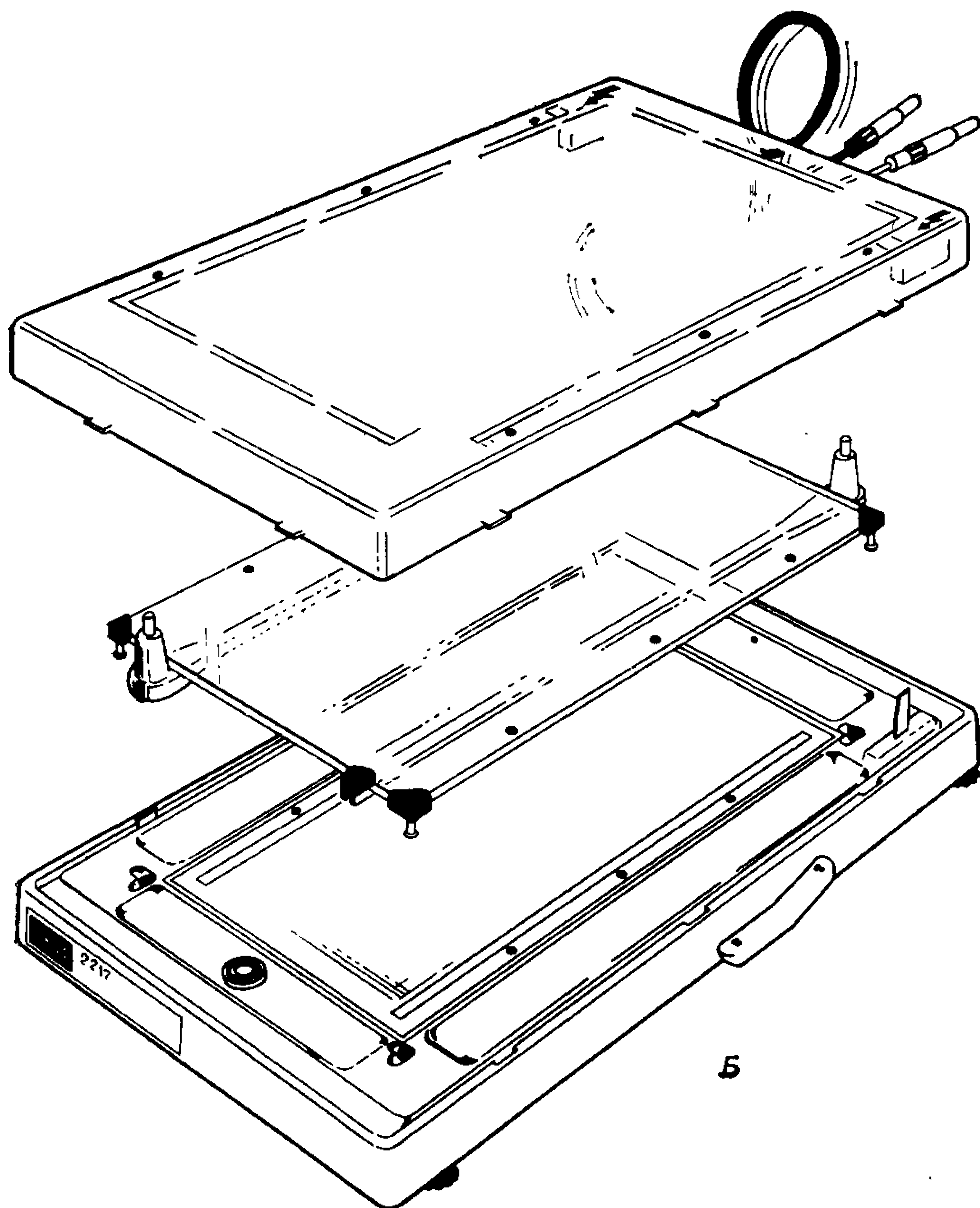


Рис. 3.10. *А*. Устройство камеры Multiphor 2117 (фирма LKB). Электроды установлены так, чтобы фокусирование осуществлялось в поперечном направлении (10 см). 1 и 2 — платиновые проволочные электроды (анод и катод соответственно) для ИЭФ в поперечном направлении, 3 — нижняя крышка с вмонтированными электродами, 4а и 4б — электродные полоски фильтровальной бумаги (анод и катод соответственно), 5 — плоский полиакриламидный гель, заполимеризованный на стеклянной пластине толщиной 1 мм, 6 — блок охлаждения, 7 — кабель, идущий к источнику питания, 8 — защитная верхияя крышка. *Б*. Устройство камеры Ultrophor 2217. Обратите внимание на подвижные электроды и плотно прилегающую нижнюю крышку, предотвращающую испарение влаги с поверхности геля. Камера устанавливается в горизонтальном положении при помощи винтовых ножек. (С любезного разрешения LKB Produkter AB.)

выми прокладками («спейсерами»), покрытыми тонким слоем водоотталкивающей смазки, обычно составляет 1—2 мм. Пластины прочно прижимают друг к другу зажимами таким образом, чтобы исключить подтекание жидкости из внутренней полости

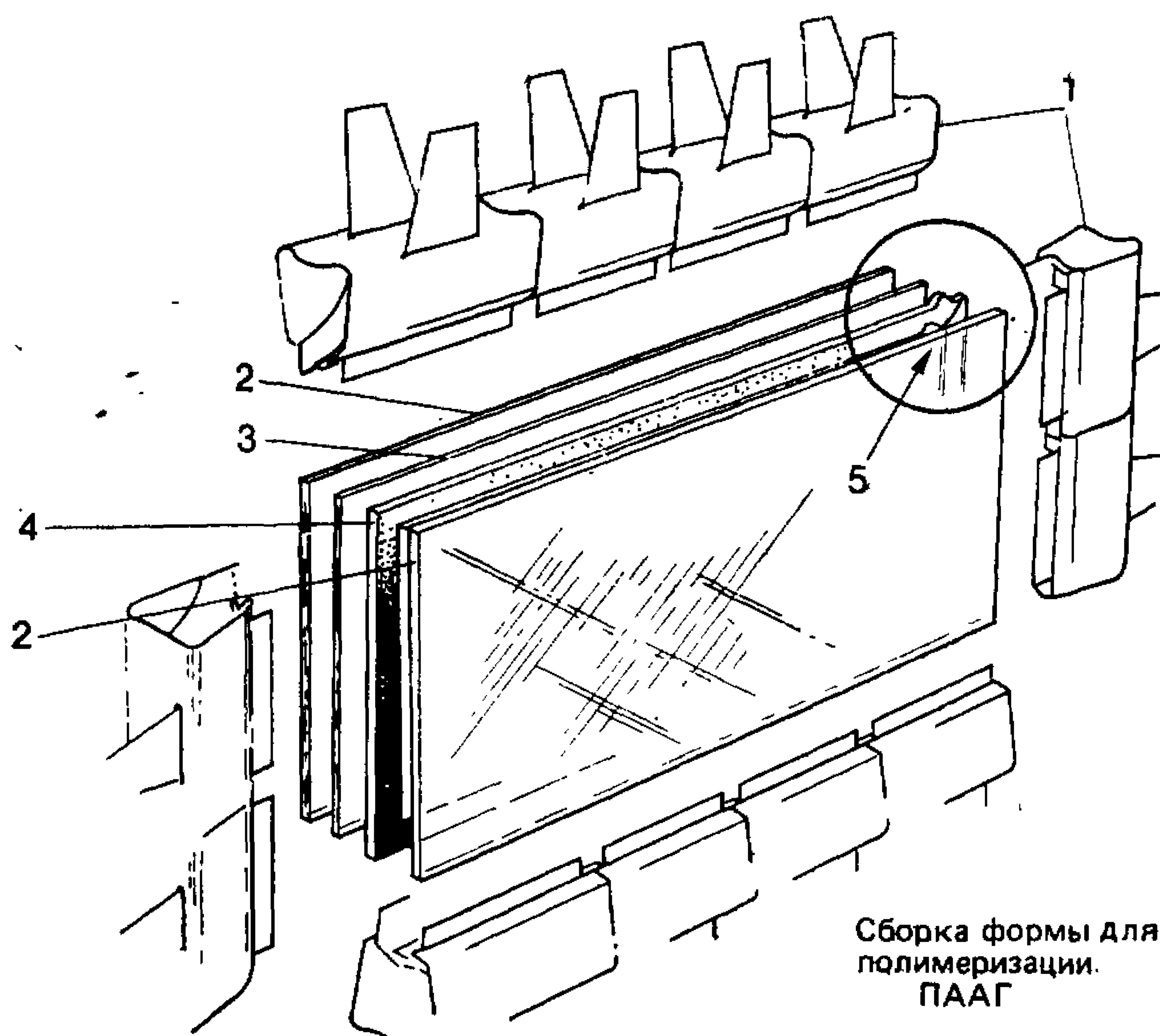


Рис. 3.11. Форма для заливки полиакриламидного геля для ИЭФ на Multiphor 2117. 1 — зажимы, 2 — стеклянная пластина размером 125×260×3 мм, 3 — стеклянная пластина размером 125×260×1 мм, 4 — резиновая прокладка, 5 — отверстие для заливки рабочего раствора мономеров. (Davis, 1975.)

(рис. 3.11). Как уже упоминалось, на одной из пластин (пластиковой) могут быть смонтированы зубцы, на месте которых на поверхности геля появляются лунки для внесения образца. Высота зубцов не должна составлять более чем 30—50% от толщины слоя геля. Более глубокие лунки могут заметно сказаться на электропроводности соответствующих участков геля и привести к локальным искажениям градиента pH. Избежать таких искажений можно, заполнив лунки густой суспензией сефадекса с рабочим содержанием амфолитов-носителей. При небольшом числе исследуемых образцов или в том случае, когда нужно проанализировать образцы в различных условиях, внутреннюю полость камеры при заливке геля можно разделить на несколько частей соответствующими перегородками. Как правило, гели заливают и полимеризуют при вертикальном положении камеры (рис. 3.12). Обе пластины должны быть очень тщательно вымыты. Одну из пластин можно покрыть специальным составом (Kodak Photo-Flow с разведением 1 : 1000) для более легкого отделения от поверхности геля. Рабочий раствор заливают в форму при помощи шприца или пипетки с узким кончиком. Целесообразно первые порции раствора заливать,

слегка наклонив камеру, с тем, чтобы предотвратить образование воздушных «карманов». По мере заполнения камеру надо постепенно переводить в горизонтальное положение. Высота геля должна соответствовать расстоянию между электродами. После заполнения камеры входное отверстие следует закупорить уплотнительной резинкой во избежание контакта с воздухом. При работе с полностью замкнутыми камерами для заливки отпадает необходимость наслаивать воду на верхнюю кромку геля. В случае приготовления геля в камере с открытым верхом на рабочий раствор следует наслоить воду, содержащую следовые количества инициаторов полимеризации, чтобы выровнять кромку и обеспечить равномерную полимеризацию геля. После завершения полимеризации камеру в горизонтальном положении помещают в холодильный шкаф или на поверхность блока охлаждения. За счет сжатия при охлаждении гель частично отходит от верхней пластины, что облегчает ее последующее удаление. Непосредственно перед началом работы с гелем следует осторожно удалить верхнюю пластину. Для этого форму кладут на стол и поднимают верхнюю пластину, поддевая ее

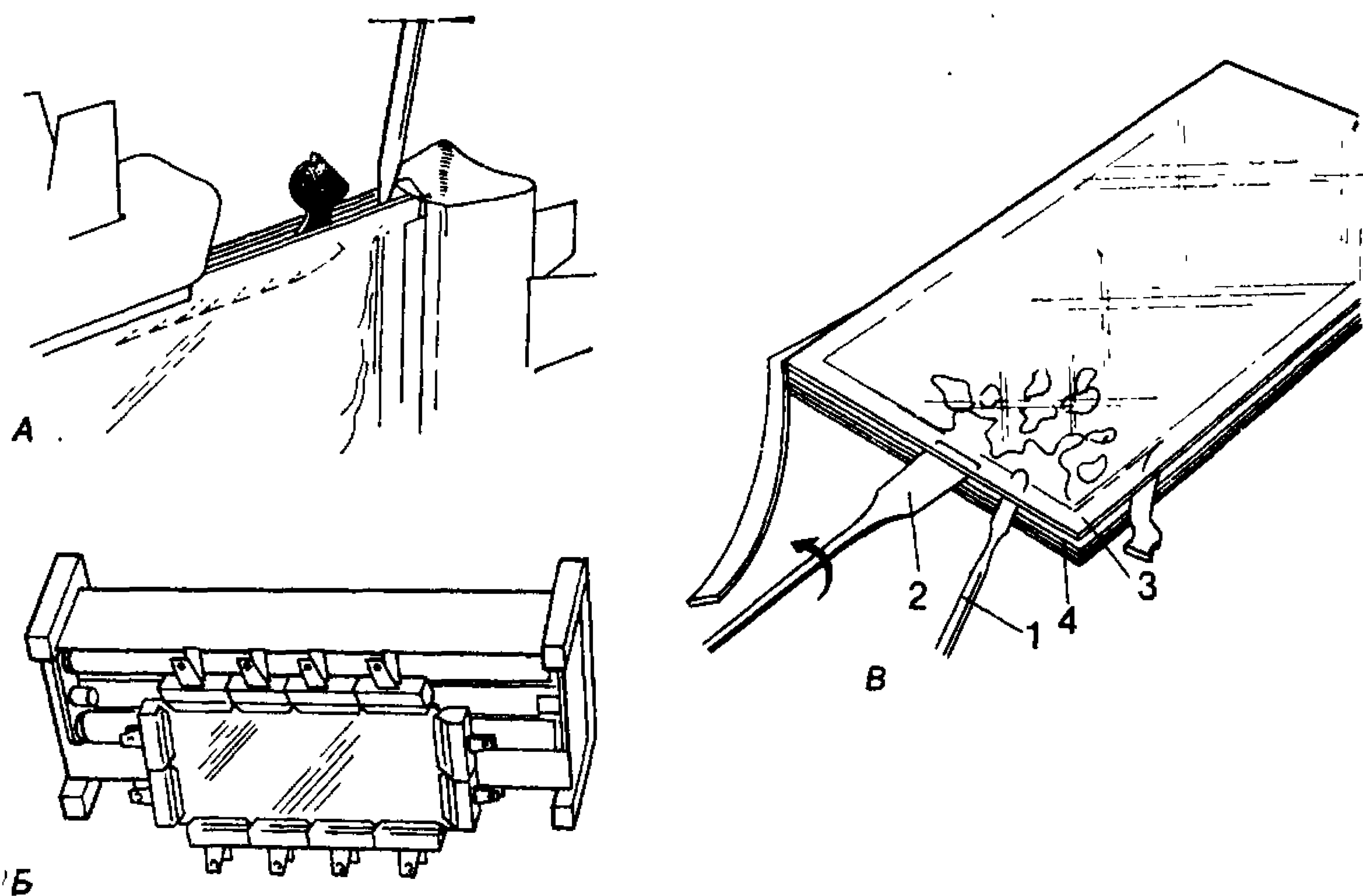
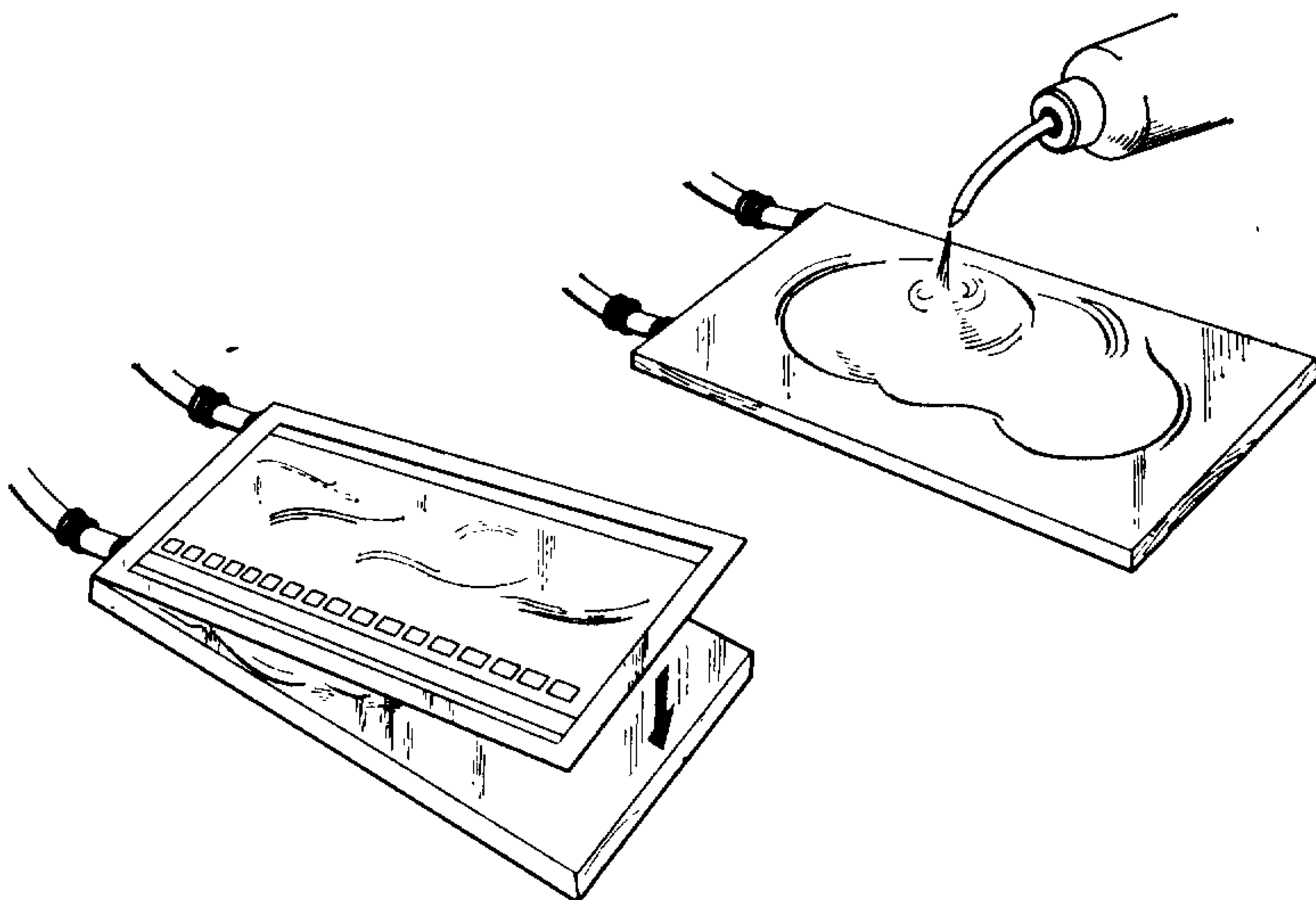


Рис. 3.12. Последовательность операций в ходе приготовления геля: заполнение формы (*А*), фотополимеризация полиакриламидного геля (*Б*) и удаление верхней стеклянной пластины с поверхности геля (*В*). Для выполнения последней операции лучше пользоваться двумя шпателями. Узким шпателем (1) слегка прижимают гель сверху, а более широкий шпатель (2) медленно поворачивают, как показано стрелкой. Когда пузырьки воздуха начинают проникать между поверхностью геля и верхней стеклянной пластиной (3), широкий шпатель осторожно поворачивают на 90°. Стеклянную пластину (3) удаляют. При этом необходимо следить за тем, чтобы гель не отделялся от нижней стеклянной пластины (4), что могло бы привести к заметному искажению зон при последующем ИЭФ. (С любезного разрешения LKB Produkter AB.)



Эффективное охлаждение пластины геля

Рис. 3.13. Установка стеклянной пластины с ПААГ на блок охлаждения. Поверхность блока предварительно смачивают раствором неионного детергента, керосином или легким парафиновым маслом. Затем осторожно накладывают пластину таким образом, чтобы избежать задержания пузырьков воздуха. Это обеспечивает равномерность охлаждения. (С любезного разрешения LKB Produkter AB.)

шпателем и упираясь, как рычагом, в нижнюю пластину (рис. 3,12). Очень важно не нарушить сцепления геля с нижней пластиной, поскольку это может вызвать локальное изменение электропроводности и искажение градиента pH. После удаления верхней пластины на поверхность геля накладывают полоски толстой фильтровальной бумаги, смоченные католитом и анолитом (как описано в разд. 3.2.10). Необходимо проконтролировать, чтобы эти полоски были наложены ровно, параллельно и на таком расстоянии друг от друга, чтобы при опускании крышки проволочные платиновые электроды (для аппаратов, в которых электроды жестко фиксированы на крышке) приходились в точности на середину электродных полосок. Для этого к большинству моделей аппаратов этого типа прикладываются трафаретные сетки, ориентируясь на которые можно точно расположить электродные полоски. После этого пластину геля помещают на поверхность блока охлаждения. Для эффективного теплоотвода желательно, чтобы между пластиной и охлаждаемой поверхностью находился слой жидкости. Для этого нижнюю поверхность пластины и поверхность блока охлаждения смачивают водным раствором какого-либо неионного детерген-

та; можно использовать также керосин или легкое парафиновое масло. Пластину следует накладывать на смоченную поверхность постепенно, таким образом, чтобы формировался ровный сплошной промежуточный слой жидкости, не содержащий пузырьков воздуха (рис. 3.13).

Полимеризация геля может осуществляться и в горизонтальном положении, например, так, как это предусмотрено фирмой Bio Rad, предлагающей специальный лоток для заливки геля. На рис. 3.14,*А* проиллюстрирован процесс заполнения формы, а на рис. 3.14,*Б* — вертикальный разрез лотка с гелем. Лоток, сделанный из пластика, оснащается несколькими парами боковых прокладок различной толщины — от 0,5 до 2 мм. Сверху на прокладки кладут стеклянную пластину (рис. 3.14,*А*), получая таким образом камеру желаемых размеров. Рабочий раствор мономеров аккуратно заливают в камеру, перемещая пипетки вдоль кромки стекла. Жидкость заполняет камеру под действием как собственного веса, так и капиллярных сил. Аналогичный принцип используется сейчас и фирмой LKB в наборе для капиллярной заливки гелей («Capillary gel casting kit»), в который входят стеклянные пластины толщиной 3 мм с прикле-

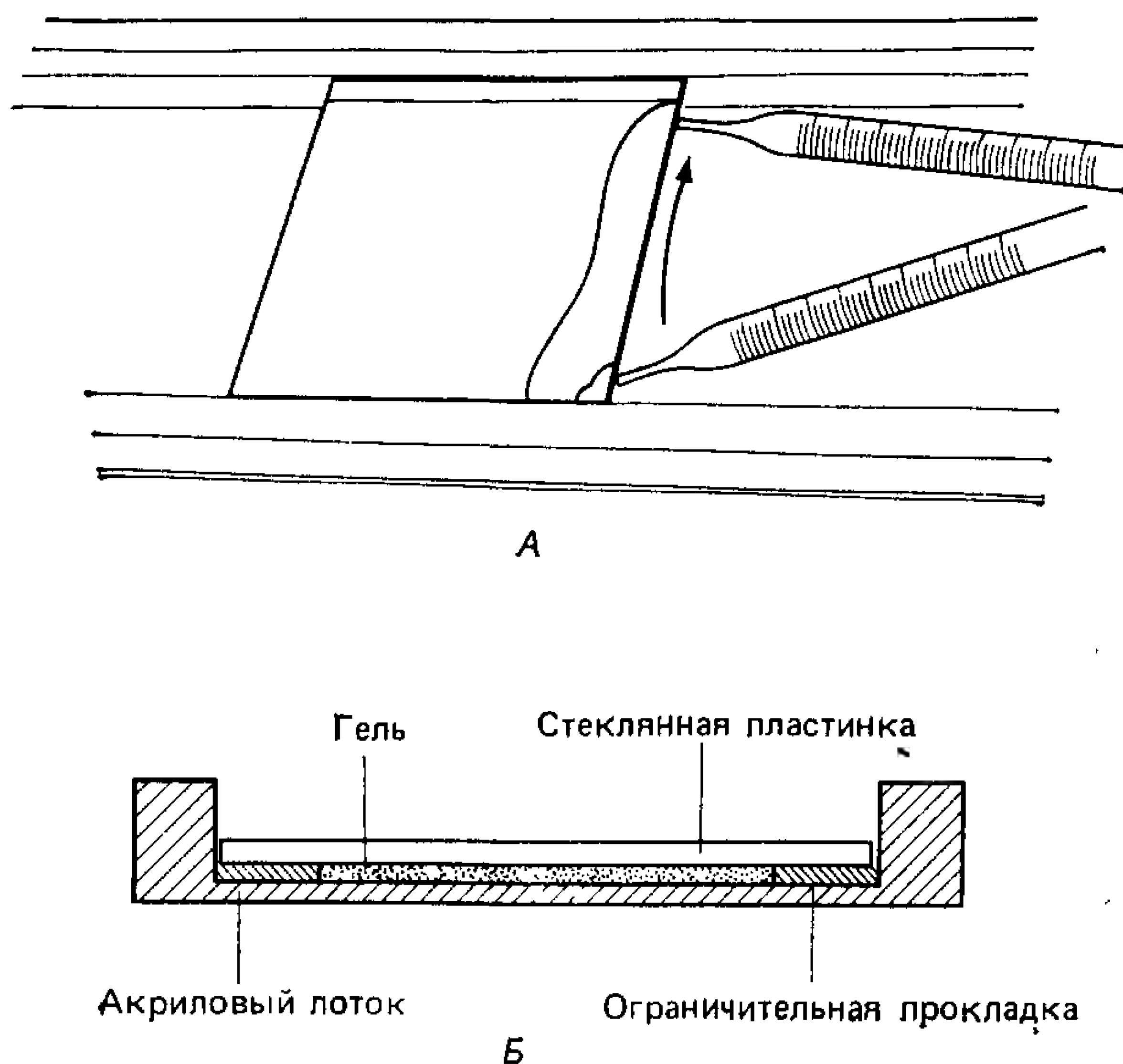


Рис. 3.14. *А*. Процесс подготовки геля с использованием камеры фирмы Bio Rad. Раствор акриламида медленно заливают в зазор между пластиной и лотком, перемещая кончик пипетки вдоль края пластины. *Б*. Вертикальный разрез камеры для полимеризации геля. (Из методического руководства Bio Rad Labs.)

енными по бокам 0,5-мм прокладками из поливинилхлорида. Сверху на такую форму накладывают другую стеклянную пластину, которая на 20 мм короче нижней, что позволяет легче заполнить 0,5-мм щель между пластинами только за счет капиллярных сил. Подробное описание этой методики приведено в работе Esen, 1981. Горизонтальный способ заливки особенно эффективен для приготовления ультратонких гелей. За дополнительной информацией по ИЭФ в пластинах геля читатель может обратиться к публикациям Davies, 1975; Karlsson et al., 1975, и Vesterberg, 1975.

Выделим еще несколько общих методических положений.

1. Эффективность охлаждения (отнесенная к единице поверхности геля) зависит от материалов, из которых изготовлены подложка геля и блок охлаждения (предлагалось использовать блоки из оксида бериллия, как в тепловых щитах, применяемых компанией NASA).

2. Наиболее эффективное охлаждение достигается при максимальном отношении площади поверхности к объему геля.

3. Чем толще слой геля, тем больше тепла будет выделяться в нем при любой фиксированной разности потенциалов. Таким образом, предпочтительнее всего проводить ИЭФ в тонкой пленке геля, вследствие чего и началось развитие техники работы с ультратонкими гелями (разд. 3.2.13).

4. Чем ниже температура охлаждающей жидкости, тем выше допустимая электрическая нагрузка на гель.

5. Сила тока в геле непосредственно зависит от рабочей концентрации амфолитов-носителей. Как уже упоминалось, в большинстве случаев для получения плавного и стабильного градиента pH необходимо, чтобы концентрация амфолинов была не ниже 2%. Различного рода добавки типа сахарозы могут повышать сопротивление геля из-за увеличения вязкости.

6. При установлении величины электрической нагрузки следует ориентироваться на такой параметр, как падение напряжения на единицу длины пути разделения. Таким образом, при ИЭФ вдоль пластины геля можно прикладывать более высокое напряжение, чем при ИЭФ в поперечном направлении.

7. Как уже отмечалось, напряженность электрического поля далеко не всегда равномерно распределяется по всему гелю. При использовании амфолинов широкого диапазона pH 3,5—10 на начальных стадиях ИЭФ в областях, примыкающих к электродам, выделяется больше тепла, чем в остальном геле (Davies, 1975). По мере установления градиента pH области повышенного выделения тепла расширяются и перемещаются к центральной части геля. При высокой электрической нагрузке участки локального перегрева можно выявить потому, что над ними отпотевает внутренняя поверхность электродной крышки.

3.2.12. Готовые пластины геля

Выпуск готовых полиакриламидных пластин для ИЭФ был впервые налажен фирмой LKB (Ampholine PAG plates). Гели толщиной 1 мм заполимеризованы на тонкой пластиковой пленке, что позволяет легко манипулировать с ними. Выпускаются готовые пластины для ИЭФ в различных интервалах pH — широком (3,5—9,5) и в нескольких узких (4—5; 4,0—6,5 и 5,5—8,5). Пластина с диапазоном pH разделения 4—5 предназначена для фракционирования фенотипических вариантов α_1-антитрипсина, фокусирующихся именно в этой области pH. Кроме того, выпускаются пластины для определения HbA_{1c} (гликозилированного производного нормального гемоглобина HbA взрослого человека, уровень которого характеризует состояние больных диабетом) с номинальным диапазоном pH разделения 6—8. В этих пластинах помимо амфолинов содержится, по-видимому, дополнительный амфотерный компонент («разделитель»), что позволяет получить более пологий градиент в области pH 7 и тем самым повысить разрешение двух близких зон HbA и HbA_{1c}. Недавно фирма Serva начала выпускать свою серию готовых пластинок (Servalyt Precotes). Эти пластинки имеют две основные отличительные особенности: во-первых, гели ковалентно пришиты к прочной полиэфирной подложке (толщиной 180 мкм) типа Gel-fix, во-вторых, сами гели — ультратонкие, толщиной 100 мкм (об ультратонких гелях см. разд. 3.2.13). Выпускаются пластины с сервалитами нескольких рабочих диапазонов pH: широкого (3—10), четырех диапазонов по 3 ед. pH (3—6; 4—7; 5—8 и 6—9), двух диапазонов по 2 ед. pH (4—6, 5—7) и, наконец, двух диапазонов по 1 ед. pH (4—5 и 7—8).

Следует отметить что наличие готовых пластин гелей для ИЭФ имеет особое значение для клинических анализов, когда ежедневно приходится исследовать множество образцов. В настоящее время фирма Serva помимо амфолитов-носителей тех диапазонов, что перечислены в разд. 1.6.2., выпускает дополнительно серии сервалитов с протяженностью рабочих диапазонов в 3 ед. pH (3—6, 4—7, 5—8 и 6—9), в 1 ед. pH (2—3, 3—4, 4—5, 5—6, 6—7 и 7—8) и даже в 0,5 ед. pH (4—4,5; 4,5—5; 5,0—5,5 и 5,5—6). Кроме того, предлагается новый препарат с широким диапазоном pH 3—10 (iso-dalt grade), который, как утверждается, позволяет получать хорошо воспроизводимые картины ИЭФ при двумерном разделении (по принципу О'Фарелла). Фирма LKB также недавно начала выпуск новой серии амфолинов (1818) следующих диапазонов pH: 3,5—9,5; 2,5—4,5; 4,0—6,5; 5,0—8,0. Это хорошо сбалансированные композиции, позволяющие получать стабильные линейные градиенты pH при ИЭФ как в полиакриламидных, так и в агарозных гелях.

3.2.13. *ИЭФ в ультратонких полиакриламидных гелях*

Этот метод является одним из самых замечательных достижений в области ИЭФ в пластинах ПААГ. Он был разработан и описан в работах Görg et al., 1977, 1978, 1979a,b, 1980a. Поскольку ультратонкие полиакриламидные гели сами по себе не обладают достаточной прочностью и рвутся в процессе окрашивания или обесцвечивания, их необходимо фиксировать на какой-либо прочной подложке. Поначалу для этой цели использовали целлофановую пленку, однако сейчас мы предпочитаем работать с полиэфирными пленками (типа Gel-fix фирмы Serva или PAG-foils фирмы LKB). Не следует путать полиэфирные подложки этого типа с пленками Gel-bond фирмы Marine Colloids. Последние предназначены для ИЭФ в агарозном геле и имеют одну гидрофобную и одну гидрофильную поверхность, образованную тонким слоем высушенной агарозной пленки. Пленки для полиакриламидных гелей получают путем частичного поверхностного гидролиза полиэфирной матрицы в 6 N NaOH и последующей обработки обеих поверхностей силанольными эфирными производными (Radola, 1980). Считается, что после такой обработки ПААГ пришивается к подложке ковалентными связями. Образование истинных ковалентных связей между гелем и пластиком мне представляется маловероятным. Скорее всего химическая обработка приводит к возникновению сетки микротрещин, благодаря которой гель прочно сцепляется с поверхностью пленки. Так, гели, полимеризованные в присутствии детергента, соскальзывают с подложки, что указывает на отсутствие ковалентных связей (см. Valkonen et al., 1980). Гели тол-

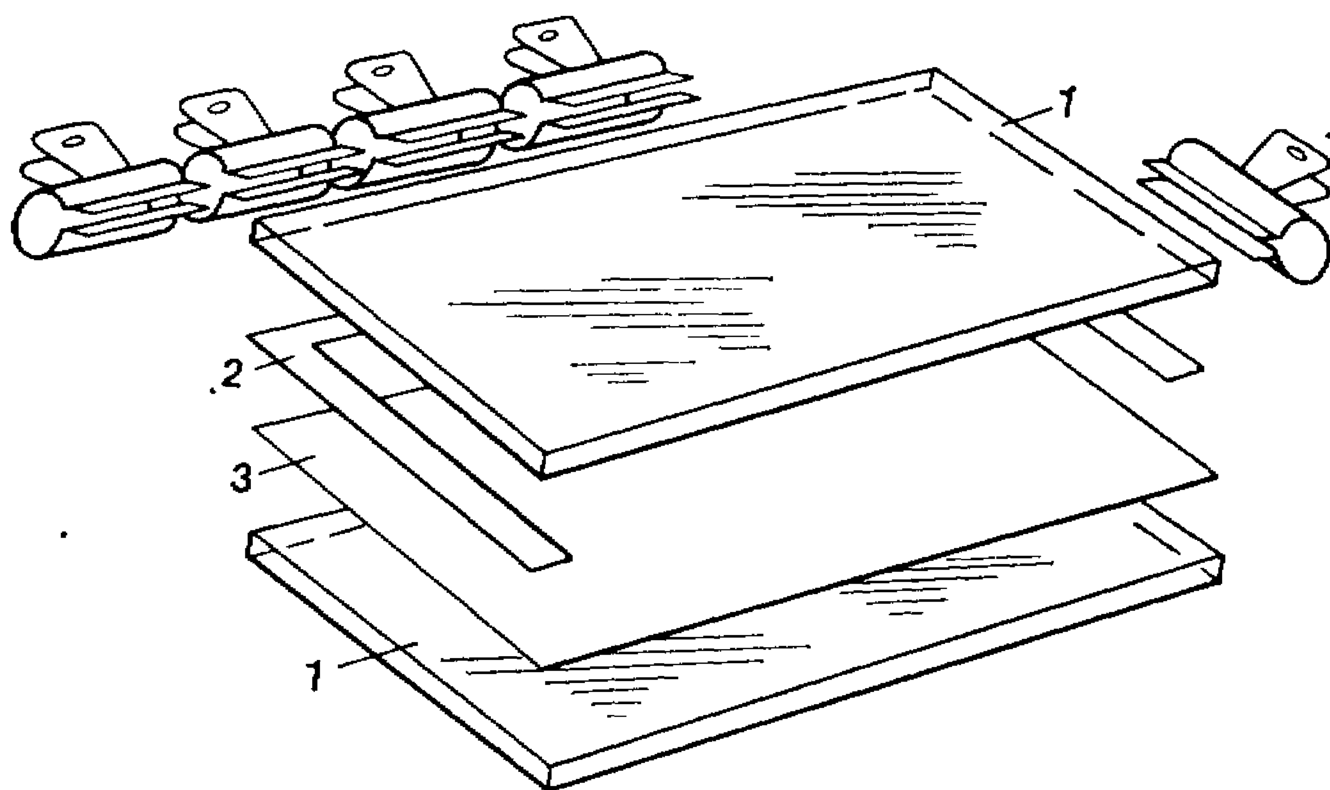


Рис. 3.15. Сборка формы для приготовления ультратонкого слоя полиакриламидного геля на полиэфирной подложке: 1 — стеклянная пластина толщиной 3 мм, 2 — П-образная прокладка, вырезанная из листа парафильма (толщина одного слоя — 120 мкм), 3 — полиэфирная пленка, (Görg et al., 1978.)

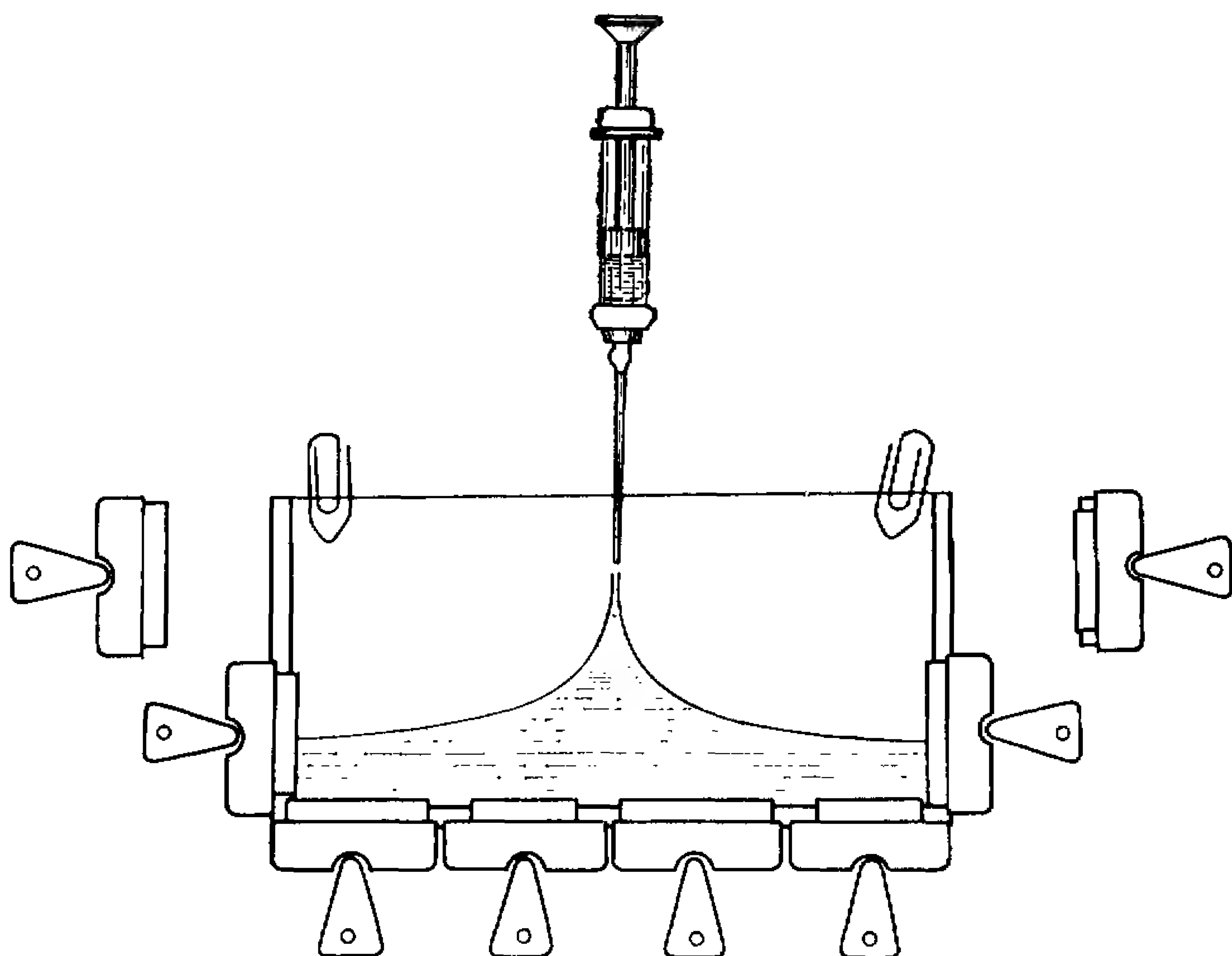


Рис. 3.16. Форма для приготовления ультратонких гелей. Чтобы облегчить заполнение формы рабочим раствором мономеров, временно снимают два верхних зажима и вставляют между стеклами две канцелярские скрепки. После заливки необходимого объема раствора скрепки снимают, а зажимы ставят на место, так что жидкость доверху заполняет форму. (Görg et al., 1978.)

щиной 120, 240 или 360 мкм могут быть получены с использованием в качестве уплотнительной прокладки П-образной рамки, вырезанной из одного, двух или трех слоев обычного лабораторного парафильма. Сборка формы для заливки геля показана на рис. 3.15. Толстую стеклянную пластинку (3 мм) смачивают водой, накладывают сверху полиэфирную пленку и накатывают с помощью резинового валика (см. рис. 3.7); ставят П-образную прокладку и сверху закрывают еще одной пластинкой. Верхнюю пластинку, если она стеклянная, для облегчения последующего удаления следует покрыть слоем реагента Photo Flow (фирмы Kodak) или 0,01%-ного раствора детергента типа Nonidet P-40. Я предпочитаю использовать пластину из толстого оргстекла (0,8—1 см), высота которой (при вертикальном расположении собранной формы) на 2 см больше высоты стеклянной пластины с полиэфирной подложкой. Это значительно облегчает заполнение камеры и позволяет легко разобрать форму, не нарушив сцепления геля с подложкой (см. также рис. 3.8,*Б*). Для облегчения заполнения формы (что в случае приготовления гелей с толщиной 120 или 240 мкм оказывается непростым делом) пользуются также следующим приемом: снима-

ют два верхних зажима и между стекол с двух сторон вставляют канцелярские скрепки. Это дает возможность ввести во внутреннее пространство иглу шприца, содержащего рабочий раствор мономеров (рис. 3.16). После удаления скрепок зажимы ставят на место, и жидкость в форме поднимается до нужного уровня.

Метод ИЭФ в ультратонких гелях обладает рядом важных преимуществ:

(а) он характеризуется значительно большей разрешающей способностью, чем ИЭФ в обычных гелях;

(б) эффективность теплоотвода существенно выше, что позволяет использовать более высокие напряжения и получать более узкие зоны, чем при ИЭФ в 1—2-мм пластинах;

(в) фиксация гелей на полиэфирной подложке, предохраняя от разрывов, делают их очень удобными в обращении на всех этапах работы;

(г) все операции по окрашиванию, удалению фона и высушиванию занимают меньше времени, чем в случае обычных гелей;

(д) расходуется значительно меньше амфолитов и других реактивов;

(е) можно очень быстро (за несколько минут) получать зимограммы, благодаря чему практически не происходит диффузионного уширения сфокусированных зон.

Для получения более тонких гелей, порядка 50—100 мкм, в работе Radola, 1980a,b был предложен модифицированный вариант заполнения формы — метод выдавливания (flap technique). Залить такой тонкий гель обычным способом практически невозможно. Суть этого метода заключается в следующем: на горизонтальную стеклянную пластину, оснащенную соответ-

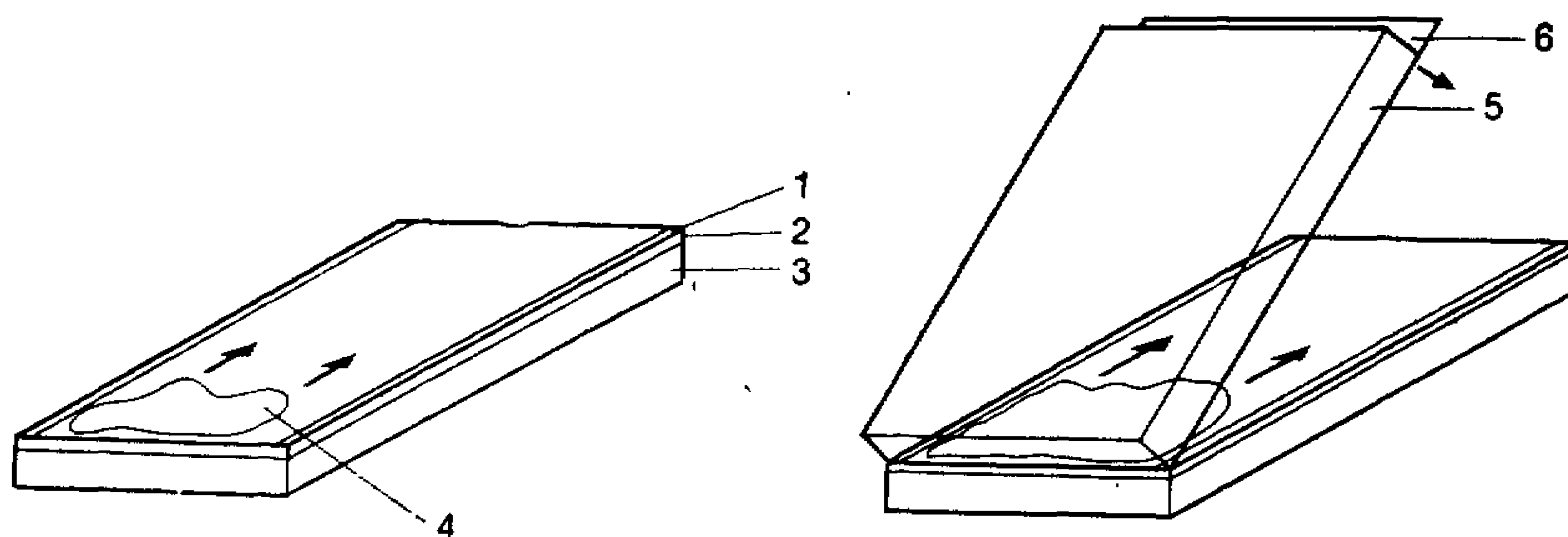
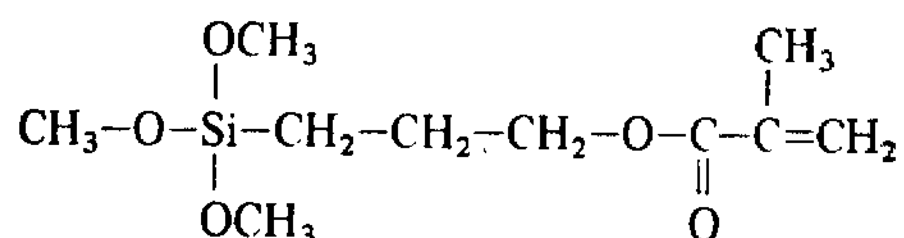
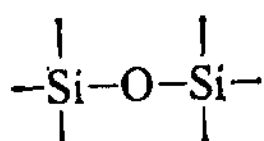


Рис. 3.17. Приготовление геля методом выдавливания (flap technique). 1 — прокладки толщиной 50 или 100 мкм, 2 — стеклянная пластина, обработанная реагентом Silane A-174, или полиэфирная пленка, 3 — нижняя стеклянная пластина, 4 — рабочий раствор мономеров, 5 — верхняя стеклянная пластина, 6 — верхняя полиэфирная гидрофилизованная пленка толщиной 100 мкм, несколько выступающая за край пластины, для облегчения извлечения готового геля. (Radola, 1980a.)

ствующими прокладками, выливают рассчитанный объем рабочего раствора мономеров. После этого постепенно опускают верхнюю пластину таким образом, чтобы жидкость распределилась ровным сплошным слоем между двумя поверхностями (см. рис. 3.17). Образующийся тонкий слой геля можно зафиксировать на полиэфирной пленке или ковалентно «пришить» к стеклянной поверхности с помощью силанольного производного (метакрилоксипропилтриметоксисилана):



В этом случае действительно реализуется ковалентное связывание геля за счет образования силанольных мостиков



между одним концом молекулы реагента и поверхностью стекла. Метакрилатная группировка на другом конце молекулы вступает в сополимеризацию с мономерными компонентами ПААГ. Этот реагент можно приобрести у фирмы Pharmacia под маркой Silane A-174, у фирмы Desaga под маркой Polyfix 1000 или непосредственно у фирмы-изготовителя (Union Carbide, Sisterville plant, West Virginia, USA) по цене несколько долларов за галлон (~4,5 л).

Ковалентная «пришивка» к стеклу с помощью Silane A-174 была использована в работе Bianchi Bosisio et al., 1980, при работе с очень ломкими гелями с высоким содержанием сшивки (биса). Я же могу предложить следующую методику: готовится 0,2%-ный раствор Silane A-174 в безводном ацетоне. Непосредственно перед полимеризацией геля тонкую чистую стеклянную пластину погружают в раствор на 30 с, вынимают, дают раствору стечь и держат на воздухе до обсыхания. Раствор реагента можно хранить в темноте при 4°С в течение нескольких месяцев. Обработанные стекла следует держать отдельно от обычных стекол, поскольку силанольное покрытие сохраняет свою активность даже на протяжении нескольких циклов полимеризации и не исчезает при мытье стекол. Поэтому если по ошибке гель окажется заполимеризован между двумя обработанными стеклами, то при разборке формы он просто порвется на две части.

Еще один вариант приготовления ультратонких гелей описан в работе Ansorge, De Mayer, 1980. Используя метод скольжения, авторам удавалось получать достаточно большие пластины

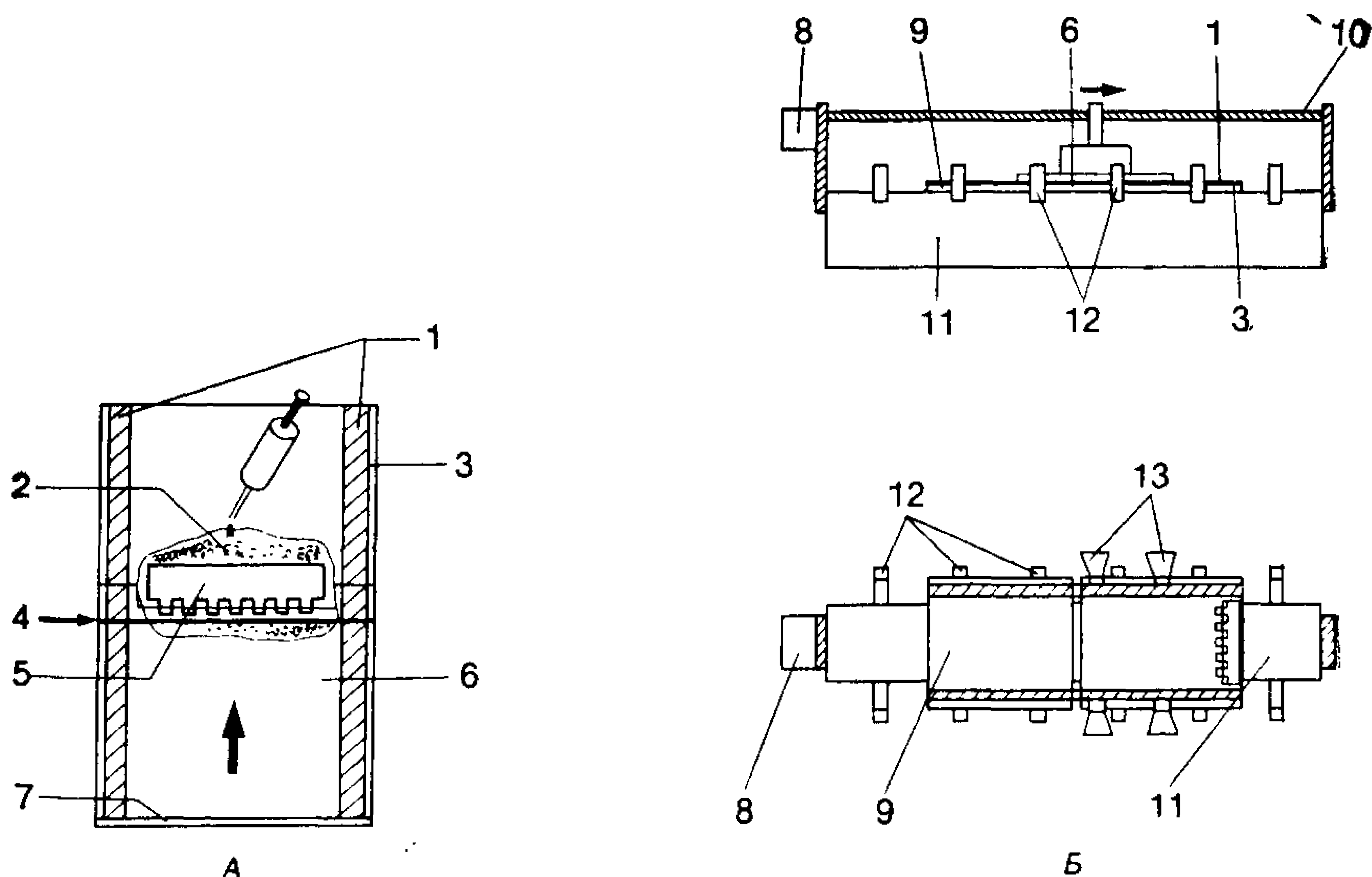


Рис. 3.18. Приготовление ультратонких гелей методом «скольжения». *А* — принцип действия. 1 — прокладки, 2 — рабочий раствор, 3 — стеклянная пластина (или термостатируемая подложка), 4 — зазор (~2 мм), 5 — гребенка, 6 — верхняя стеклянная пластина (с вырезом для контакта с электролитом), 7 — вспомогательный блок. *Б*. Устройство системы. 8 — мотор, 9 — вспомогательная пластина, 10 — вал, 11 — горизонтальная основа, 12 — направляющие выступы, 13 — зажимы. (Ansorge, De Mayer, 1980.)

геля (до 60 см) толщиной от 100 до 300 мкм. Устройство и функционирование этой системы проиллюстрировано на рис. 3.18. Между направляющими выступами, расположенными по бокам горизонтальной основы, помещают пластину, которая служит подложкой для геля. Рядом с этой пластиной на небольшом расстоянии кладут еще одну, вспомогательную пластину такой же толщины. По краям обеих пластин устанавливают тонкие тефлоновые прокладки, поверх которых накладывают третью, верхнюю, пластину. Вначале ее размещают таким образом, чтобы она покрывала в основном вспомогательную пластину и лишь на несколько миллиметров заходила на рабочую пластину. Благодаря системе направляющих выступов верхняя пластина может скользить по прокладкам только в одном измерении. При медленном скольжении верхней пластины удается равномерно распределить рабочий раствор в виде сплошного слоя между нижней (рабочей) и верхней пластинами. После окончания заполнения формы пластины можно плотно прижать друг к другу с помощью зажимов.

Использование ультратонких гелей представляет собой одно из важнейших нововведений в технологии ИЭФ, которое, воз-

можно, вытеснит прочие традиционные методы аналитического ИЭФ. По-видимому, особенно перспективно применение гелей этого типа для двумерного фракционирования, причем не только на стадии ИЭФ, но и на стадии ДДС-Na-электрофореза (Görg et al., 1980b, 1981).

3.2.14. *Внесение образца при ИЭФ в плоских и цилиндрических гелях*

При работе с обычными горизонтальными пластинами геля для внесения образцов можно использовать самые разные способы; подходят шаблоны любого типа, будь то лунки или рамочки, не позволяющие раствору образца растекаться по поверхности геля. В готовой пластине ПААГ фирмы LKB предусмотрено одновременное фокусирование 20 образцов в треках шириной 1 см. Для внесения образцов удобно пользоваться небольшими лунками, однако можно наносить их и непосредственно на поверхность геля просто в виде капель раствора или с помощью кусочков подходящего носителя, смоченных раствором образца. Некоторые способы внесения образцов показаны на рис. 3.19. Правильный выбор материала носителя имеет боль-

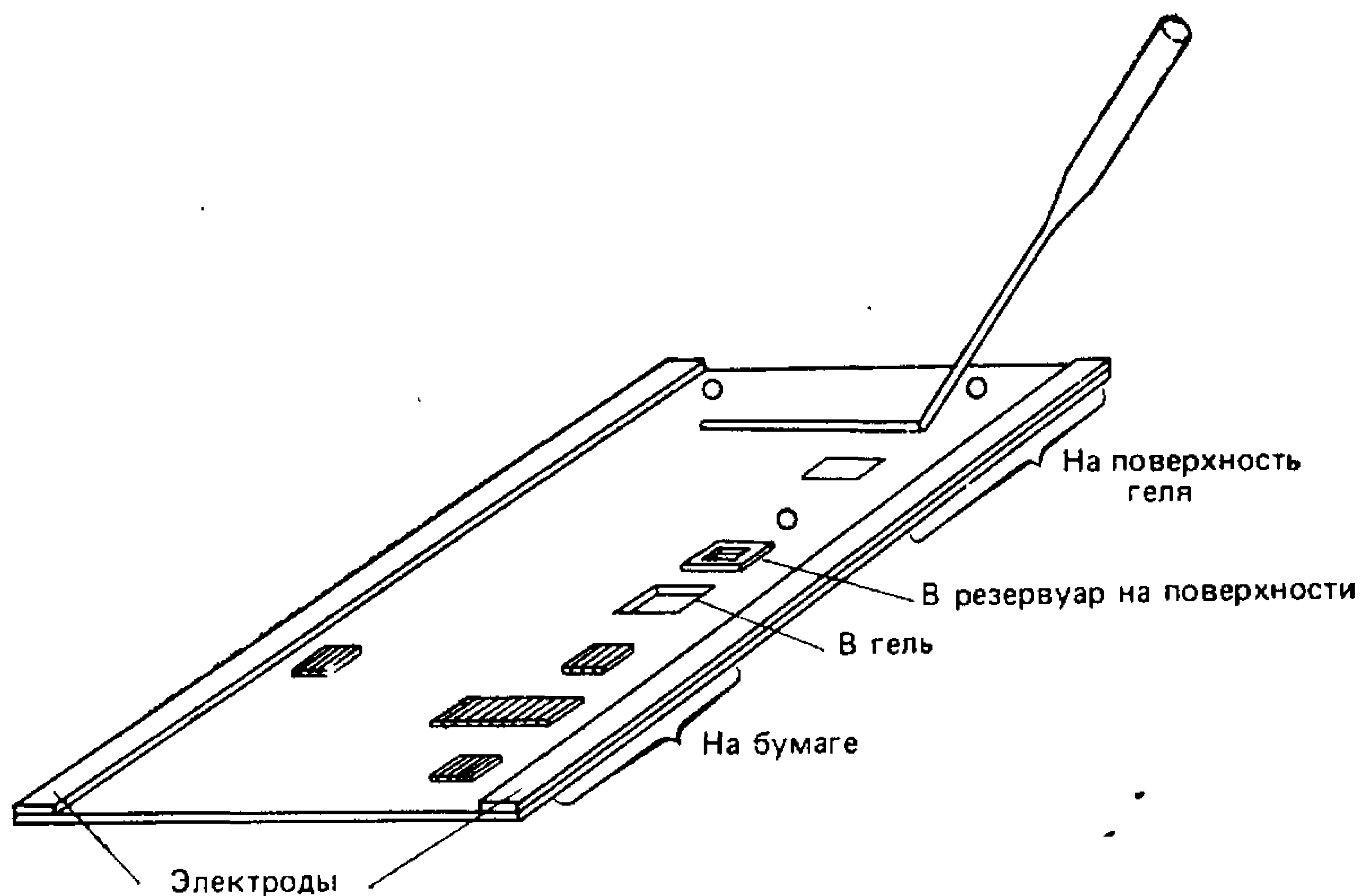


Рис. 3.19. Различные способы нанесения белкового раствора на гель для ИЭФ. *Снизу вверх:* квадратик фильтровальной бумаги, смоченный раствором образца; прямоугольный кусочек бумаги; два квадратных кусочка, расположенных вблизи каждого из электродов; лунка, вырезанная в геле; небольшой резервуар на поверхности геля; капля на поверхности; капля, размазанная по поверхности в форме квадрата; полоска раствора на поверхности; две капли, расположенные вблизи каждого из электродов. (Vesterberg, 1973c.)

шое значение. Так, отмечалось, что многие белки с трудом переходят в гель с широко используемых для нанесения образцов кусочков фильтровальной бумаги (Waldström, Smyth, 1975a). В этом случае лучше пользоваться ацетилцеллюлозой или высушенным полиакриламидом.

Растворы с неизвестной концентрацией образца можно наносить с помощью кусочков фильтровальной бумаги, вырезанных в форме остроугольного треугольника. Сфокусированные зоны будут выглядеть как длинные тонкие полосы с линейно нарастающей интенсивностью, по которым можно оценить величину оптимальной загрузки данного образца для последующих экспериментов. Сильно разбавленные образцы можно наносить с помощью длинных прямоугольных полосок бумаги или подходящего размера желобков в геле. С помощью желобка можно нанести до 150 мкл раствора, в который при этом следует добавить амфолиты в такой же концентрации, что и в геле, для того, чтобы избежать локального искажения градиента pH. Ввиду того что полоски различных носителей могут неконтролируемо адсорбировать непредсказуемое количество образца, сейчас для нанесения предпочитают пользоваться специальными лентами из силиконовой резины с прорезанными в них круглыми или щелевидными отверстиями. Впервые этот метод был описан в работе Altland, 1977. Теперь, стоит только поставить дополнительный третий электрод (катод или анод) в середину геля, по обеим сторонам от него наложить две ленты из силиконовой резины — с 48 круглыми отверстиями в каждой — и можно анализировать 96 образцов в одном геле (рис. 3.20). Сообщалось также об использовании для внесения образцов пластикового шаблона с прямоугольными отверстиями (Ghuat, Pilon, 1977).

Обычно стараются расположить полоски для внесения образцов в той части геля, где не происходит фокусирования основных компонентов. Во избежание неблагоприятного воздействия экстремальных значений pH не следует вносить образцы слишком близко к электродам. Расстояние между местом внесения образца и ближайшим электродом должно составлять 10—15% всей длины геля. Лучше всего вносить образцы в гель с уже сформировавшимся градиентом pH. Полоски для внесения образцов следует накладывать на поверхность геля аккуратно, избегая попадания пузырьков воздуха.

При работе с цилиндрическими гелями образец наносят непосредственно на верхний срез геля или вводят в состав геля до полимеризации. Наносить образец сверху можно на любом этапе ИЭФ, при этом для увеличения плотности раствора образца к нему следует добавить глицерин или сахарозу до концентрации 5—10%, а также амфолиты-носители до концентра-

ции 2—4%. Присутствие амфолитов предохраняет образец в процессе его проникновения в гель от прямого контакта с кислотой или щелочью в электродном растворе. Добавление следовых количеств бромфенолового синего или другого не связывающегося с белками красителя существенно облегчает контроль за ходом нанесения бесцветного образца. Введение образца в гель до полимеризации целесообразно в случае анализа больших объемов разбавленного материала. Этот способ пригоден только в том случае, если образцы не подвержены неблагоприятному влиянию со стороны компонентов гелеобразующего раствора или тепла, выделяющегося при полимеризации; отметим, что температура в геле в процессе полимеризации может возрастать до 40 °С (Righetti, Righetti, 1975).

При анализе белков, присутствующих в моче, спинномозговой жидкости и других физиологических жидкостях, возникают две серьезные проблемы — низкое содержание белка и высокая концентрация соли. Это затрудняет непосредственное проведение ИЭФ. Изящное решение проблемы было предложено в работе Vesterberg, Hansén, 1978. Белки адсорбируют из жидкости на маленькой колонке с гидрофобным гелем — фенил-сефарозой, что позволяет их одновременно сконцентрировать и обессолить. Элюция достигается при непосредственном нанесении сорбента на поверхность геля. Сочетание низкой ионной силы при ИЭФ, низкой температуры в геле[1] и высокой напряженности

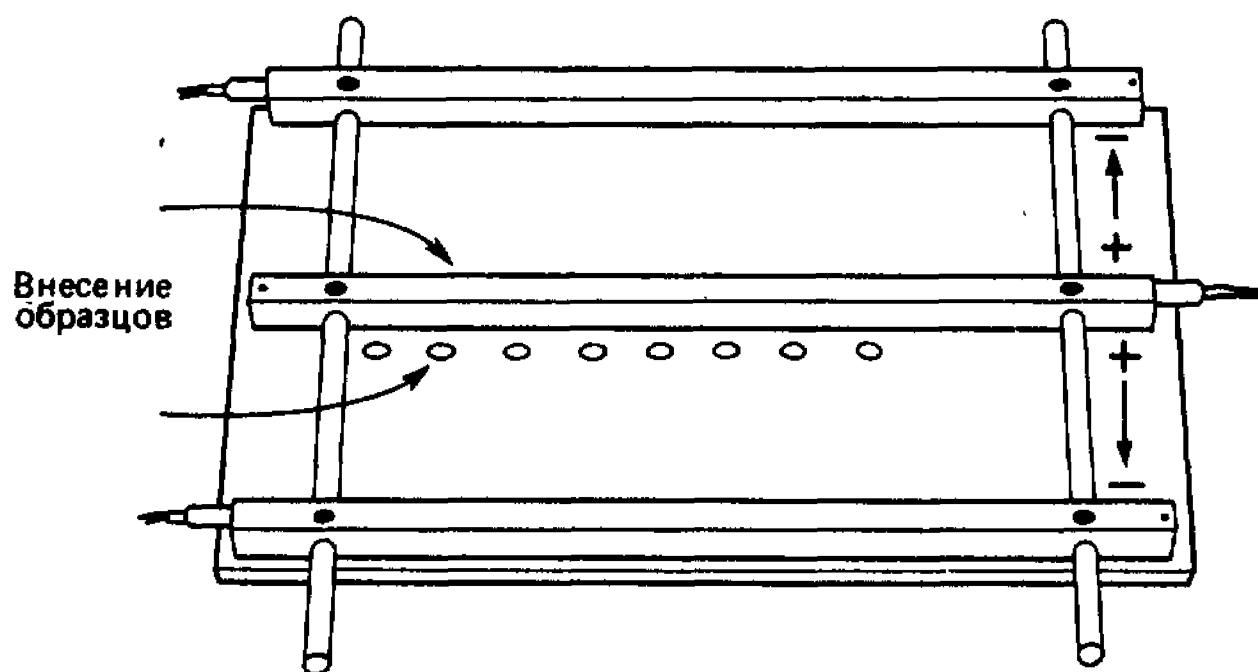


Рис. 3.20. Трехэлектродная система ИЭФ в геле, позволяющая удвоить число одновременно тестируемых образцов. (Из каталога G фирмы Bio Rad 1981.)

[1] Поскольку при понижении температуры гидрофобные взаимодействия усиливаются, а не ослабевают, следует признать, что низкая температура в геле в данном случае едва ли может положительно сказываться на десорбции белков с фенил-сефарозы. — *Прим. перев.*

поля способствует весьма эффективному движению адсорбировавшихся белков от сефарозной матрицы по направлению к своим pI. Любопытно, что аналогичный подход оказывается очень ценным и при элюции белков с сорбентов в случае аффинной хроматографии (Haff et al., 1979).

3.2.15. *Высушивание гелей*

Хотя гели можно хранить и во влажном состоянии, запечатав их с помощью простых приспособлений между двумя прозрачными пластиковыми пленками (Yu, Spring, 1978), для детектирования и регистрации радиоактивности (методом радиоавтографии или флюорографии) необходимо использовать высушенные гели. При высушивании без какой-либо подложки полиакриламидные гели сжимаются и деформируются. С помощью подложки из фильтровальной бумаги гель удается высушить с сохранением первоначальных размеров благодаря его прочному сцеплению с бумагой. В настоящее время целый ряд фирм (Bio Rad, LKB, Pharmacia) выпускает приборы для сушки пластин ПААГ, основанные на принципе одновременного воздействия вакуума и нагревания. После фиксирования белков, окрашивания и отмывания фона гель вымачивают в течение нескольких часов (для ультратонких гелей достаточно 30 мин) в 3—5%-ном глицерине, содержащем достаточное количество метанола для предотвращения разбухания. В случае градиентных гелей необходимо повысить концентрацию глицерина до 10—15%, иначе наиболее плотные участки геля при высушивании могут растрескаться. На сетчатую подложку прибора, сделанную обычно из нержавеющей стали, накладывают два листа фильтровальной бумаги типа ватмана 3ММ. На эти листы аккуратно кладут гель таким образом, чтобы между бумагой и гелем не осталось пузырьков воздуха, которые могут вызвать растрескивание геля при сушке. Гель покрывают куском вымоченной заранее целлофановой пленки, а затем пластиной из пористого пластика. Сверху все это покрывается закрепленной в приборе мягкой герметизирующей крышкой из силиконовой резины. Прибор подсоединяется к водоструйному или масляному вакуумному насосу, одновременно включается система нагревания. Время сушки должно независимо подбираться в каждой лаборатории, поскольку оно зависит от типа геля (а также от глубины вакуума и эффективности системы нагревания). При несвоевременной разгерметизации системы (до полного высыхания) происходит необратимое растрескивание геля. После сушки получают «сэндвич», в котором высушенный гель находится между слоем фильтровальной бумаги и защитной целлофановой пленкой.

Все эти операции оказываются ненужными при работе с ультратонкими гелями, фиксированными на полиэфирной под-

ложке. После вымачивания геля в 3%-ном глицерине его можно высушить просто на воздухе или в сушильном шкафу при 40—50 °С. Было описано несколько лабораторных способов высушивания гелей без использования упоминавшихся выше приборов (Lin et al., 1969; Hebert, Strobbel, 1974; Maizel, 1971; Mayer, 1976). После фокусирования пептидов в ультратонком геле на него накладывают кусок фильтровальной бумаги (ватман 3ММ) и тотчас же помещают в сушильный шкаф на 110 °С. За несколько минут гель полностью высыхает, благодаря чему пептиды фиксируются в зонах своих pI. После этого бумагу можно опрыснуть набором специфических красителей для аминокислот — так, как это делается с бумажными хроматограммами (Gianazza et al., 1979b).

3.2.16. ИЭФ в цилиндрических гелях

В большинстве случаев для ИЭФ используют цилиндрические гели таких же размеров, как и для обычного аналитического электрофореза, т. е. длиной 5—15 см и диаметром 0,2—0,5 см. Некоторые авторы используют для ИЭФ также традиционные электрофоретические аппараты, однако мне кажется, что почти все системы этого типа можно было бы существенно улучшить путем организации более эффективной системы охлаждения и переустройства электродных отсеков. Простой способ решения проблемы теплоотвода с помощью термостатирования трубок геля в циркулирующем охлаждаемом электродном растворе был предложен в работе Fawcett, 1968. Автор учел также необходимость минимизации объема электролитов и предложил остроумное решение проблемы — погружать платиновые электроды прямо в слой раствора амфолинов в верхней части каждой трубки. В работе Righetti, Drysdale, 1971, описана разработанная авторами конструкция аппарата для ИЭФ в трубках. Его важнейшие особенности — это эффективная система охлаждения, малый объем электролитов и максимально сближенное взаимное расположение электродов и гелей. Этот аппарат схематически изображен на рис. 3.21. Трубки с гелем находятся в изолированном центральном отсеке между электродными камерами. В этом отсеке непрерывно циркулирует охлаждающая жидкость. Наружная цилиндрическая стенка центрального отсека примерно на 2,5 см возвышается над горизонтальной верхней перегородкой, образуя верхнюю электродную камеру. Нижняя электродная камера сделана в виде отдельного блока, являющегося основанием всей конструкции. В качестве электродов используются кольцевые платиновые проволочки. Верхний электрод смонтирован на внутренней стороне крышки, а нижний — на внутренней стороне нижней электродной камеры. Оба

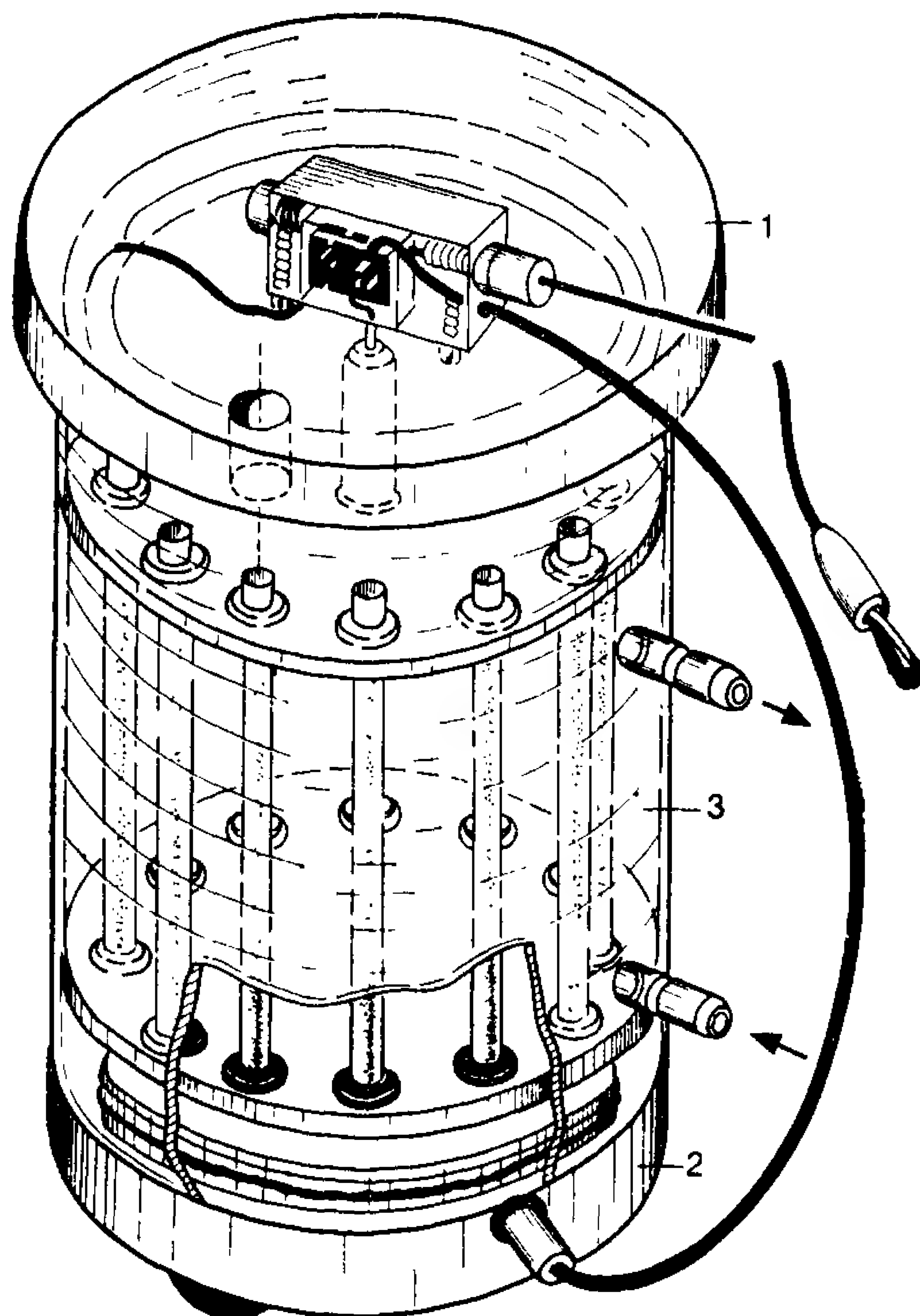


Рис. 3.21. Схематическое изображение аппарата для аналитического ИЭФ в трубках (Righetti, Drysdale, 1971, 1973). 1 — верхний электродный отсек с системой аварийного отключения, 2 — нижний электродный отсек. После замены центрального отсека (3) система может быть использована для препаративного ИЭФ в гелях. (С любезного разрешения Medical Research Apparatus.)

конца трубок контактируют с жидкостью в электродных камерах и фиксируются уплотнительными резиновыми кольцами в соответствующих отверстиях в верхней и нижней перегородках. После сборки аппарата электроды располагаются на расстоянии менее 1 см от концов трубок. Через специальное отверстие в верхней крышке аппарата (которая свободно вращается вокруг центрального опорного стержня) образцы наносят прямо на поверхность гелей, не снимая крышки. Через это же отверстие верхнюю камеру при необходимости можно заполнить газом. Небольшие отверстия для отвода или заполнения газом прорезаны также в верхнем ободке нижней камеры. Наконец, на крышке камеры поставлен контрольный прерыватель, связанный с обоими электродами, который замыкает электрическую цепь только при правильной установке крышки на центральном

опорном стержне. При поднятии крышки или при случайном падении аппарата прерыватель срабатывает и отключает напряжение от обоих электродов. В прибор обычно вставляют 12 трубок длиной 10 см с внутренним диаметром 3 мм (объем около 1 мл), но, поменяв резиновые втулки, можно использовать и трубки другого диаметра. Предпочтительное использование 3-мм гелей связано с тем, что при таком диаметре еще достигается достаточно эффективное охлаждение. Сами трубки могут быть пластиковыми, стеклянными или кварцевыми. Стеклянные трубки лучше рассеивают тепло, однако в случае пластиковых трубок полностью отсутствуют поверхностные осмотические эффекты, обусловленные наличием зарядов на поверхности стекла. И все же лучше использовать именно стеклянные трубки, поскольку по сравнению с пластиковыми они характеризуются значительно более прочным сцеплением с гелем. При необходимости чистые трубки из термостойкого стекла можно покрыть 1%-ным раствором реагента Gelamide 250 (поставляется фирмой Polysciences, Warrington, PA), который блокирует пристеночные электроэндосмотические токи, часто сопутствующие ИЭФ в стеклянных трубках.

Общие указания по выбору состава и условий полимеризации гелей были приведены в разд. 3.2.8 и 3.2.9, а по выбору электродных растворов — в разд. 3.2.10. Для заливки гелей используют те же приемы, что и при обычном электрофорезе. Стеклянные трубки закрывают снизу парафильмом, пластилином или заглушками типа Vacutainer tops и устанавливают вертикально на строго горизонтальную поверхность. После заполнения трубок до нужной высоты (обычно не доходя 0,5—1 см до верха) на рабочий раствор мономеров наслаивают воду, содержащую некоторое количество смеси инициаторов полимеризации.

Использование трубок для ИЭФ совершенно необходимо только тогда, когда требуются строго анаэробные условия или минусовая температура при фракционировании. За исключением этих частных случаев, сегодня подавляющее большинство экспериментаторов, как правило, предпочитает проводить ИЭФ в горизонтальных пластинах и особенно в ультратонких гелях.

3.2.17. Микро-ИЭФ

Распространенные в настоящее время методы ИЭФ в трубках или пластинах геля позволяют регистрировать белки на уровне нескольких микрограммов. Однако при работе с очень небольшими количествами белка может понадобиться специальная система, позволяющая проводить регистрацию и на уровне нанограммов. В одной из систем такого типа (Grossbach, 1972)

ИЭФ проводят в кварцевых капиллярах сечением 50, 100 и 300 мкм и длиной 65 мм (производства Heraeus Quarzshmelze, Hanau, Germany). В состав гелей входят акриламид (7%), амфолины (2%), сахароза (20%). Образец, содержащий по 20—70 нг каждого белкового компонента, вносят в раствор мономеров до полимеризации. Разделительные микротрубочки заполняются за счет капиллярных сил. После полимеризации концы капилляров заполняют 2%-ным раствором амфолинов с помощью микропипетки с микроманипулятором. Затем капилляры присоединяют к обычному прибору для электрофореза с помощью короткой стеклянной трубки и пробки из силиконовой резины с отверстием. ИЭФ проводят при комнатной температуре и напряжении 100 В в течение 10—120 мин. Сразу же после ИЭФ гели выталкивают из капилляров с помощью плотно пригнанного стального поршня на вогнутое стекло с небольшим количеством 20%-ной ТХУ. Разрешение при ИЭФ в таких капиллярах сопоставимо с разрешением в обычных 3—5-мм трубках. Однако в капиллярных гелях, как правило, наблюдается продольное смещение картины распределения белков, а при длительном фокусировании зоны мигрируют к одному из концов геля и в конце концов выходят в электродный раствор. По-видимому, это связано с интенсивным электроэндосмотическим потоком вдоль стенок кварцевой трубки. Этот поток, вероятно, становится особенно ощутимым из-за высокого отношения площади внутренней поверхности капилляра к объему геля.

В работе Gainer, 1973, описан микрометод, позволяющий регистрировать белки на уровне 10^{-10}—10^{-9} г. Автор полимеризовал 7,5%-ный или 5,5%-ный ПААГ, содержащий амфолины в концентрации 2%, в стеклянных капиллярах (типа Corning 7740; внутренний диаметр 0,58 мм, наружный 1,15 мм, длина 7 см). После полимеризации гели устанавливали в специальный прибор для микроэлектрофореза (Gainer 1971) таким образом, что верхняя часть каждого капилляра попадала в анодную камеру, содержащую 0,3%-ную H_2SO_4, а нижняя — в катодную камеру, содержащую 0,5%-ный этанолдиамин. Для удаления избытка персульфата проводили предварительное фокусирование в течение 30 мин, а затем образцы (по 5—50 нг каждого компонента в образце) наносили в верхнюю часть капилляра. При напряжении 120 В и комнатной температуре за 3 часа достигалось равновесие. Белковые зоны в микрогеле после окрашивания проявлялись в виде очень узких полос (меньше 0,2 мм), что позволяло регистрировать вплоть до 10^{-10} г белка в зоне. В работе Gainer, 1973, при ИЭФ в микрогелях для многих щелочных белков были обнаружены более высокие значения pI, чем при ИЭФ в обычных гелях. Возможно, при работе с микрогелями в меньшей степени сказывается поглощение CO_2 из воздуха,

что весьма ценно для ИЭФ в щелочной области pH. Дополнительные сведения по микро-ИЭФ можно найти в книге «Микрометоды в молекулярной биологии» (Neuhoff, 1973, p. 49—56).

Описаны также системы, основанные на применении миниатюрных пластин геля (Rüchel, 1977; Matsudaira, Burgess, 1978; Ogita, Market, 1979; Poehling, Neuhoff, 1980), главным образом на второй стадии в методе двумерного ИЭФ—ДДС-Na-электрофореза. Часто для заливки используют камеры стандартного размера (30×25×0,1 мм) и в них гели полимеризуют на обрезанных до нужного размера предметных стеклах. В качестве прокладок используют небольшие полоски, вырезанные из пластиковой пленки толщиной 0,1—0,2 мм. Стеклянные пластинки по бокам прижимают миниатюрными зажимами, расплавленным зубоврачебным воском или изоляционной липкой лентой. Если толщина геля меньше 0,25 мм, то необходимость в герметизации формы снизу отпадает, поскольку при такой толщине слоя капиллярные силы препятствуют вытеканию жидкости. При необходимости герметизации снизу нижнюю часть формы вдавливают в слой пластилина, покрытого сверху парафильмом. Одну из пластин перед сборкой формы обрабатывают (метакрилоксипропилтриметоксисиланом) так, чтобы гель оставался зафиксированным на ней, в том числе и при окрашивании зон. Применение миниатюрных ультратонких гелей в сочетании с окраской серебром (разд. 3.3.2) дает возможность анализировать субнанограммовые количества белка. Сообщалось, что при ИЭФ в плоских микрогелях длиной 3 см равновесие в распределении белковых зон достигается всего лишь за 10 мин. При уменьшении расстояния между электродами до 1 и 2 см время фокусирования снижается до 2 и 4 мин соответственно. Время, которое занимают фиксация белков, окрашивание, удаление фона и сушка геля, составляет всего около 5 мин. Микро-ИЭФ представляется весьма перспективным методом, несмотря на то что для фотографирования или сканирования микрогелей может потребоваться специальная аппаратура.

3.2.18. ИЭФ при минусовых температурах

Этот прием представляет собой важный вклад, внесенный криобиохимией (Douzou, 1977) в арсенал электрофоретических методов. О первых попытках изучения «гибридных» тетрамеров гемоглобина с помощью ИЭФ при минусовых температурах сообщалось в работе Park, 1973. Автору удалось понизить температуру при фракционировании всего лишь до $-5 \div -10$ °С. Опубликованные сравнительно недавно работы Perrella et al., 1978, 1979, 1980, ознаменовали существенный прогресс в этой области. Основные проблемы, которые пришлось решать, заключа-

лись в подборе эффективного метода термостатирования, подходящего состава геля, который был бы не подвержен стеклованию при температурах ниже $-15\,^{\circ}C$, и подходящего водно-органического антифриза. При решении этих проблем использовали модифицированный вариант аппарата для ИЭФ в трубках (Righetti, Drysdale, 1971, 1973), оснащенного дополнительными змеевиками охлаждения верхней и нижней электродных камер (см. рис. 3.21). Для быстрого отвода джоулева тепла использовали узкие стеклянные трубки (внутренний диаметр 2 мм). Гель представлял собой сополимеры акриламида и метакрилата или этакрилата и выдерживал температуры до $-40 \div -50\,^{\circ}C$ без заметной перестройки матрицы. Что касается водно-органического состава, то лучшие результаты были получены с использованием смеси ДМСО—вода, ранее предложенной в работе Righetti et al., 1977. Теоретически ИЭФ можно проводить при -30 и даже при $-40\,^{\circ}C$, однако ввиду крайне высокой вязкости растворителя и слишком низкой подвижности белков при таких температурах лучше работать при температурах не ниже $-20\,^{\circ}C$.

Еще одна проблема возникает в связи с преципитацией кислых амфолитов ($pI<5$), по-видимому в результате агрегации, что вызывает серьезные искажения градиента pH в зоне преципитации. Таким образом, наиболее эффективно можно проводить ИЭФ в диапазоне pH выше 5 при температуре не ниже $-20\,^{\circ}C$ в 37%-ном водном растворе ДМСО. Смесь такого состава обладает пониженной вязкостью и выдерживает температуры до $-30\,^{\circ}C$.

Этим методом удавалось регистрировать образование «гибридных» гемоглобиновых тетрамеров HbA—HbS из исходных молекул HbA и HbS (Perrella et al., 1979), а также серии промежуточных продуктов при окислении HbCO. Недавно этим же авторам удалось исследовать профиль градиента pH при $-20\,^{\circ}C$ с помощью метода индикаторных красителей, предложенного Douzou, 1977. Вообще говоря, совместное влияние 37%-ного ДМСО и низкой температуры ($-20\,^{\circ}C$) должно повышать все эффективные значения pI сфокусированных амфолинов (номинальных диапазонов pH 6—8 или 7—9) примерно на 1 ед. pH по сравнению с ИЭФ при $+4\,^{\circ}C$ в водной среде. Тем не менее, например, для случая карбонильного производного HbA определенно установлено, что значение его pI в аналогичной ситуации в такой же степени сдвигается в щелочную область pH. Крио-ИЭФ, судя по всему, является весьма эффективным методом изучения таких процессов, как обмен субъединицами, связывание лигандов или образование фермент-субстратных комплексов.

3.3. Методы детектирования белков в гелях

3.3.1. Способы окрашивания

Для окрашивания белков после ИЭФ необходимо использовать специально разработанные методики, поскольку амфолиты-носители образуют нерастворимые комплексы со многими красителями, применяющимися для окрашивания белков. Одно из методических решений этой проблемы заключается в кислотном осаждении сфокусированных белков (например, 10%-ной ТХУ) и последующем тщательном вымывании кислоторастворимых амфолитов из геля. После удаления амфолитов белки можно окрашивать традиционными методами. На сегодняшний день разработан ряд прямых методов окрашивания, позволяющих опустить трудоемкую процедуру вымывания амфолитов и основанных на солюбилизации комплексов амфолитов с красителем под влиянием органических растворителей и (или) повышенной температуры (Righetti et al., 1977). В качестве примеров приведу прописи нескольких используемых методов окрашивания.

Быстрый зеленый (Fast Green) FCF (Riley, Coleman, 1968). Этот краситель применяют для регистрации зон при содержании белка более 10 мкг (в расчете на 3-мм гель). Гели погружают на 4—8 ч в 0,2%-ный водный раствор красителя (поставляется Fisher Scientific, NJ, USA), содержащий 10% уксусной кислоты и 25% этанола. Зоны, окрашенные *быстрым зеленым* FCF, со временем постепенно выцветают.

Светло-зеленый (Light Green) SF. Этот метод был использован в работе Radola, 1973a, для окрашивания бумажных реплик. После получения реплики с геля на бумаге ее вымачивают 15 мин в ТХУ. Удаляют ТХУ, погружая бумагу на несколько минут в смесь метанол : вода : уксусная кислота (с объемным соотношением 33 : 66 : 10). После этого окрашивают в течение 15 мин в такой же смеси, содержащей краситель *светло-зеленый* SF в концентрации 0,2%. Фон удаляют промыванием тем же раствором без красителя. Чувствительность окрашивания в 3—5 раз ниже, чем при использовании СВВ R-250 или G-250. Благодаря этому метод с успехом использовался для окрашивания с хорошим разрешением участков реплики, соответствующих очень высокому содержанию белков (Radola, 1973a). Окрашивание СВВ на этих участках привело бы к появлению размазанных, плохо разрешенных зон.

Бромфеноловый синий (Bromphenol Blue) (Awdeh, 1969). Гель погружают на 3 ч в 2%-ный водный раствор бромфенолового синего, содержащий 50% этанола и 5% уксусной кислоты. Обесцвечивают фон 5%-ной уксусной кислотой в 30%-ном водном растворе этанола. Обращаться с гелем при окрашивании

следует очень осторожно, избегая соприкосновения его с кожей, тканью, бумагой и другими сухими поверхностями.

Кумасси ярко-синий (Coomassie Brilliant Blue) R-250. Существует несколько методик прямого окрашивания белков (после ИЭФ) с помощью этого популярного чувствительного красителя. Здесь приводятся четыре варианта.

1. По Hayes, Wellner, 1969. После ИЭФ гель фиксируют в растворе, содержащем 5% ТХУ и 5% сульфосалициловой кислоты, в течение 1 ч. После этого промывают еще в течение 1 ч тремя литрами воды для удаления избытка кислоты. Окрашивание проводят в течение 3—4 ч в 0,066%-ном растворе СВВ R-250, приготовленном в 0,2 *М* трис-HCl-буфере pH 7,7. Для удаления фона гель отмывают разбавленным 0,001 *М* трис-HCl-буфером pH 7,7 в течение 24—48 ч.

2. По Spencer, King, 1971. Этот метод широко применяется для быстрого окрашивания сфокусированных белковых зон. Белки связывают краситель из его слабого (0,01%-ного) водного раствора, содержащего 5% ТХУ, 5% сульфосалициловой кислоты и 20% метанола. Чувствительность метода ниже, чем в случае применения других методик окрашивания СВВ, однако удается получать очень слабый фон. Кроме того, весь процесс проходит от начала до конца в одном и том же растворе. Обычно оказывается достаточно окрашивать гель в течение 1 ч. Интенсивность окрашивания зон можно повысить, увеличив концентрацию красителя до 0,05%, но при этом повышается и интенсивность фонового окрашивания.

3. По Vesterberg, 1972. В этом методе окрашивание белков СВВ в присутствии амфолитов достигается за счет обработки геля в течение 15 мин при 60 °С 0,1%-ным водным раствором красителя, содержащим 28% метанола, 11% ТХУ и 3,5% сульфосалициловой кислоты. Обесцвечивание фона проводится также при 60 °С 8%-ной уксусной кислотой в сочетании с 25%-ным этанолом в воде. Этот метод в большей степени подходит для пластин ПААГ, чем для цилиндрических гелей. К сожалению, быстро окрашивающиеся зоны часто имеют тенденцию к постепенному выцветанию. Кроме того, при использовании этой методики краситель стремится к преципитации на поверхности геля, особенно в трещинах. Модификация метода была описана в работе Söderholm et al., 1972. Сразу же после ИЭФ гель погружают в водный раствор, содержащий 2% сульфосалициловой кислоты, 11% ТХУ и 27% метанола, термостатируемый при 65 °С. Через 20 мин гель дважды отмывают «обесцвечивающим» раствором (8,5%-ная уксусная кислота — 27%-ный этанол в дистиллированной воде) при 20 °С, а затем окрашивают в 0,1%-ном СВВ R-250, приготовленном на обесцвечивающем растворе. Впоследствии было описано еще четыре варианта этой методи-

ки (Vesterberg, Hansén, 1977) с применением различных комбинаций ТХУ, сульфосалициловой кислоты, хлорной кислоты и мочевины в фиксирующем растворе. По-видимому, в присутствии мочевины интенсивность окрашивания возрастает за счет дополнительного разворачивания белковых цепей. Чувствительность метода достигает примерно 0,2 мкг белка на зону.

4. По Righetti, Drysdale, 1974. Нам удалось разработать метод, одинаково пригодный для окрашивания как плоских, так и цилиндрических гелей и сочетающий высокую чувствительность с низким уровнем фона. Гели погружают на 4—6 ч в 0,05%-ный раствор красителя, содержащий 0,1% сульфата меди в смеси уксусная кислота : этанол : вода (19 : 25 : 65). Обесцвечивание фона производится в течение 4 ч тем же раствором, но содержащим только 0,01% CBB R-250, а в конце просто смесью уксусная кислота : этанол : вода (10 : 10 : 80). К гелю можно прикасаться только в перчатках, так как при использовании этой методики прокрашиваются отпечатки пальцев!

В работе Malik, Berrie, 1972, описана методика окрашивания белков раствором CBB R-250, приготовленным с использованием серной кислоты, КОН и ТХУ. Прокрашивание белков происходит быстро, но сопровождается развитием заметного фона.

Кумасси ярко-синий (Coomassi Brilliant Blue) G-250. В работе Diezel et al., 1972, было впервые описано применение CBB G-250 (диметилпроизводное красителя CBB R-250) в виде коллоидного раствора в 12,5%-ной ТХУ. Это позволило добиться селективного связывания красителя с белковыми зонами, при котором не происходит проникновения коллоидных частиц в матрицу геля и, таким образом, не возникает фонового окрашивания. При последующей обработке геля 5%-ной уксусной кислотой интенсивность окрашивания белковых зон повышается за счет солюбилизации красителя, связанного с поверхностным белковым слоем, его диффузии внутрь геля и дополнительного связывания с внутренними участками соответствующих белковых зон. Было обнаружено, что в 0,04%-ном CBB G-250, приготовленном в 3,5%-ном растворе хлорной кислоты, краситель остается в форме лейкооснования, а при связывании с белками переходит в голубую форму (Reisner et al., 1975). Амфолины при такой обработке в осадок не выпадают, но в геле появляется оранжево-коричневый фон. Сообщалось, что при дополнительной промывке 5%-ной уксусной кислотой удается повысить чувствительность в 3 раза (Holbrook, Leaver, 1976), однако фон при этом также становится сильнее. Одна из последних модификаций метода, описанная в работе Blakesley, Boezi, 1977, является, по-видимому, идеальным методом окрашивания зон после ИЭФ. К 400 мл 0,2%-ного раствора краси-

теля в H_2O добавляют равный объем 2N H_2SO_4. Через 3 ч удаляют осадок фильтрованием через ватман 3ММ. К прозрачному фильтрату коричневого цвета добавляют 90 мл 10 N KOH, после чего раствор приобретает пурпурную окраску. Добавляют еще 120 мл 100%-ной ТХУ и образовавшийся зеленоватый раствор используют для окрашивания белков. Краску можно использовать несколько раз, если pH в растворе не поднимается выше 1. (Оказывается, что при повторном использовании окрашивание происходит лучше, чем при употреблении свежей краски, вероятно за счет удаления каких-то примесей, которые обладают свойством осаждать амфолины нейтрального диапазона; Righetti, неопубликованные данные), В пластинах геля толщиной 0,7 мм максимальное окрашивание достигается за 5 ч, хотя полосы становятся различимыми уже через 15 мин. После перенесения геля в воду интенсивность окраски заметно возрастает. Этот метод дает прекрасные результаты в случае ИЭФ пептидов, позволяя фиксировать и регистрировать даже пептиды из 12—15 аминокислот (Righetti, Chillemi, 1978).

Флуоресцентные красители. Методы анализа, основанные на предварительном прокрашивании образцов, достигли очень высокого уровня чувствительности с появлением флуоресцентных красителей, таких, как дансилхлорид (Talbot, Yaphantis, 1971),

Таблица 3.3. Окрашивание белков после ИЭФ в слое гранулированного геля с использованием метода бумажных реплик (Radola, 1973a)

Краситель	Промывание 10%-ной ТХУ (число раз)	Концентрация красителя, %	Объемные соотношения в смеси метанол : вода : уксусная кислота		Относительная продолжительность отмывания фона[2])	Чувствительность, мкг белка[3])
			окрашивание	отмывание фона		
Amido Black 10 B	3	0,2	50:50:10	66:33:10	10—20	5—10
Bromophenol Blue	0 или 1[1])	0,1	66:33:10	40:60:10	2—5	3—5
Coomassie Brilliant Blue G-250	3	0,2	50:50:10	33:66:10	3—5	0,5—1
Coomassie Brilliant Blue R-250	3	0,2	50:50:10	33:66:10	3—5	0,5—1
Coomassie Violet R-150	0 или 1[1])	0,2	50:50:10	33:66:10	2—3	2
Light Green SF	0 или 1[1])	0,2	33:66:10	33:66:10	1	3

Перед окрашиванием удаляли амфолиты-носители вымачиванием в ТХУ (смены через 15—30 мин). После этого в течение нескольких минут вымывали ТХУ смесью метанол — вода — уксусная кислота (33 : 66 : 10). Окрашивали реплику 15—30 мин, время от времени перемешивая раствор, а затем отмывали фон в нескольких сменах (по 5—15 мин) соответствующего раствора. Жидкость от первых двух промывок отбрасывали, а от других промывок — обесцвечивали активированным углем и использовали снова.

[1]) В удалении амфолитов-носителей нет необходимости, но однократное промывание ТХУ способствует быстрому и более равномерному удалению фона при последующих промывках.

[2]) Для красителя Light Green SF время, необходимое для полного отмывания фона, составляло 20—30 мин.

[3]) Число мкг белка при нанесении образца в виде 18-мм зоны.

флуорескамин (Stein et al., 1973; Handschin, Ritschard, 1976) и 2-метокси-2,4-дифенил-3(2Н)-фуранон (МДФФ) (Barger et al., 1976). С помощью последнего реагента удается регистрировать вплоть до 1 нг белка в зоне. Однако, за исключением случаев введения следовых количеств метки в образец, как правило, нельзя быть уверенным, что в результате предварительного окрашивания не изменятся истинные значения pI белков и не произойдет искусственного повышения гетерогенности исследуемой смеси. Поэтому такие методы, как и предварительное ковалентное связывание катионного красителя типа Drimarene Brilliant Blue K-BL (Bosshard, Datyner, 1977), практически неприменимы для анализа методом ИЭФ. Сообщалось, что на самом деле предварительное окрашивание некоторых белков флуорескамином оказывает влияние даже на их подвижность при электрофорезе в ДДС-Na, где, вообще говоря, подвижность должна зависеть только от массы молекул (Ragland et al., 1974). Если учесть, что реакция флуорескамина с белками, по существу, приводит к замене аминогрупп в белках на карбоксильные, то становится понятным, что подробная обработка обязательно приведет к изменению эффективных значений pI даже при введении следовых количеств метки.

В табл. 3.3 указаны различные методы окрашивания бумажных реплик, полученных после ИЭФ в слое гранулированного геля (Radola, 1973a). В табл. 3.4 перечислены наиболее популярные красители, используемые при электрофорезе и ИЭФ.

3.3.2. *Окрашивание серебром*

Этот метод представляет собой, пожалуй, самое поразительное достижение в развитии методов окрашивания белков. Считается, что по чувствительности он, как минимум, в 100 раз превосходит окрашивание СВВ, т. е. приближается к радиоавтографии. Впервые метод был описан в работе Switzer et al., 1979, в качестве модифицированного варианта медно-серебряного окрашивания (по de Olmo, 1969). Я приведу здесь три важнейших методики: упрощенный вариант (Oakley et al., 1980), фотохимическое окрашивание (Merril et al., 1981) и цветное окрашивание (Sammons et al., 1981).

1. Упрощенная методика окрашиванния серебром по Oakley et al., 1980 (была разработана для пластин геля размером 140×140×0,8 мм). *1-й этап.* Гель вымачивают 30 мин в 10%-ном водном растворе глутарового альдегида. [В случае ИЭФ гели следует предварительно выдерживать в 10%-ной уксусной кислоте на 50%-ном этаноле для удаления амфолитов-носителей в течение по крайней мере 45 мин (для гелей толщиной 0,35 мм) и затем еще 45 мин в 5%-ной уксусной кислоте на 5%-ном ме-

Таблица 3.4. Красители и окрашенные маркеры для электрофореза[1)]

Краситель	Индекс цветности (№)	λ max (поглощение)	Применение	Литературный источник
Amido Black 10 B (Buffalo Black, Naphtalene Black 10 B)	20,470	620	Универсальный краситель для белков	Wilson, 1973
Coomassie Brilliant Blue R-250	42,660	590	Универсальный краситель для белков, примерно в 10 раз более чувствительный, чем Amido black	Fairbanks et al., 1971
Coomassie Brilliant Blue G-250	42,655	595	Универсальный краситель для белков	
Alcian Blue	74,240	630	Гликопротеины	Wardi, Michos, 1972
Uniblue A	14,552	—	Краситель для белков	Datyner, Finnimore, 1973
Methylene Blue	52,015	665	РНК, РНКаза	Peacock, Dingman, 1967
Methyl Green	42,590	635	Нативная ДНК, кислый или нейтральный маркер	Boyd, Mitchell, 1965
Fast Green FCF	42,036	610	Краситель для белков	Gorovsky et al., 1970
Basic Fuchsin	42,500	550	Гликопротеины	Zacharius, Zell, 1969
			Нуклеиновые кислоты и гликопротеины, богатые сиаловой кислотой	Dahlberg et al., 1969
Pyronin Y	45,005	510	РНК, кислый маркер	Chrambach et al., 1976
Bromphenol Blue	—	595	Нейтральный и щелочной маркер	Awdeh, 1969
Bromocresol Green	—	—	Маркер для электрофореза ДНК в агарозном геле	Mc Donnel et al., 1977
Crocein Scarlet	26,905	505	Иммуноэлектрофорез	Crowle, Cline, 1977
Xylene Cyanole FF	43,535	—	Маркер при определении нуклеотидной последовательности ДНК	Maxam, Gilbert, 1977
Toluidine Blue O	52,040	620	РНК, РНКаза, мукополисахариды	Righetti, Drysdale, 1972
Ethidium Bromide	—	—	Флуориметрия ДНК	Sharp et al., 1973
Stains All	—	—	Универсальный краситель для белков	Green et al., 1973

[1)] Bio Rad Labs. Catalogue G (1981). *Замечание:* не все перечисленные красители могут быть непосредственно использованы при ИЭФ.

таноле.] Следует использовать очищенный глутаровый альдегид категории Biological grade. *2-й этап.* Погружают гель на 10 мин в дистиллированную (в стекле) воду (0,5—1 л), меняют воду дважды и оставляют в воде не меньше чем на 2 ч (по возможности лучше на ночь). *3-й этап.* Сливают воду и добавляют свежий аммиачный раствор серебра, который готовится следующим образом (в расчете на 100 мл раствора) : 1,4 мл концентрированного водного раствора аммиака прибавляют к 21 мл 0,36%-ного NaOH, все время перемешивая смесь, медленно добавляют 4 мл 19,4%-ного раствора $AgNO_3$ (для приготовления которого 20 г $AgNO_3$ растворяют в 100 мл дистиллированной воды). Коричневый осадок, который может образоваться при добавлении раствора $AgNO_3$ к щелочи, при перемешивании постепенно исчезает. Гель должен свободно плавать в растворе (следует взять 100—150 мл раствора). Во избежание выпадения серебра на поверхности геля время окрашивания не должно превышать 15 мин. *4-й этап.* Переносят гель в другой резервуар с дистиллированной водой и отмывают в течение 2 мин. *5-й этап.* Помещают гель в свежеприготовленный 0,005%-ный раствор лимонной кислоты в 0,019%-ном формальдегиде (который получают, разбавляя 38%-ный формальдегид 10—15%-ным метанолом). На этом этапе становятся видны окрашенные белковые зоны. Как только начинает проявляться темный фон, гель извлекают из раствора и начинают промывать (не менее 1 ч). В случае «переэкспонирования» в красителе гель можно частично обесцветить в фотоослабителе Kodak rapid fixer. Обесцвечивание можно остановить, перенеся гель в другой состав — Kodak hypo cleaning agent с нормальным (1 : 4) разбавлением.

2. Фотохимическое окрашивание серебром по Merril et al., 1981. Фиксируют гель в 50%-ном метаноле — 12%-ной уксусной кислоте не менее 20 мин, а затем 3 раза по 10 мин промывают порциями по 200 мл раствора, содержащего 10% этанола и 5% уксусной кислоты. После этого 5 мин вымачивают гель в 200 мл раствора, содержащего бихромат калия (3,4 мМ) и азотную кислоту (3,2 мМ). Промывают четырьмя порциями дистиллированной воды (по 200 мл по 30 с) и на 30 мин помещают гель в 12 мМ раствор $AgNO_3$ (200 мл). Максимальная чувствительность достигается при интенсивном освещении в течение первых 5 мин инкубации с помощью яркой флуоресцентной лампы. Развитие окраски происходит в процессе быстрой промывки двумя порциями по 300 мл раствора, содержащего 0,28 М карбонат натрия и 0,5 мл аптечного формалина (на 1 л раствора). Гель промывают третьей порцией этого раствора до достижения желаемой интенсивности окрашивания. Останавливают окрашивание перенесением геля в 1%-ный раствор уксусной кислоты. Повышение чувствительности за счет освещения наблюдается

Таблица 3.5. Последовательность операций при цветном окрашивании серебром гелей после электрофореза (по Sammons et al., 1981)

Операции	Растворы	Продолжительность обработки
Фиксирование	50%-ный этанол, 10%-ная уксусная кислота	2 ч или более
Промывание	50%-ный этанол, 10%-ная уксусная кислота	2 ч
	25%-ный этанол, 10%-ная уксусная кислота	Дважды по 1 ч
	10%-ный этанол, 0,5%-ная уксусная кислота	Дважды по 1 ч
Обработка серебром	$AgNO_3$ (1,9 г/л)	2 ч или более
Промывание	H_2O	10—20 с
Восстановление серебра	$NaBH_4$ (87,5 мг/л) и HCHO (7,5 мл/л) в 0,75 N NaOH	10 мин
Усиление цветности	Na_2CO_3 (7,5 г/л)	1 ч
	Na_2CO_3 (7,5 г/л)	1 ч, хранение

только при работе с гелями толщиной менее 1 мм. Сообщалось, что предельная чувствительность метода достигает 0,01 нг белка на 1 $мм^2$.

3. Цветное окрашивание серебром по Sammons et al., 1981. Последовательность операций в этом методе приведена в табл. 3.5. Гель выдерживают в течение ночи в 50%-ном этаноле — 10%-ной уксусной кислоте (объем геля: объем раствора = 1 : 5,5). Такая длительная обработка необходима главным образом для гелей, содержащих ДДС-Na, а после ИЭФ достаточно, как правило, 1—2 ч (в зависимости от толщины геля). Если нет возможности сразу приступить к окрашиванию, то можно оставить гель в растворе последней стадии промывки — 10%-ный этанол — 0,5%-ная уксусная кислота. Существенно, что используемые при окрашивании растворы перед употреблением должны быть деаэрированы. Оптимальная концентрация $AgNO_3$ для 1,5-мм гелей составляет 1,9 г/л; равновесие окрашивания достигается при этом за 2 ч. Оптимальное соотношение объемов геля и окрашивающего раствора — 1 : 3. Восстанавливающий раствор содержит NaOH (0,75 М), формальдегид (7,5 мл/л; готовится из 37%-ного аптечного формалина) и $NaBH_4$ (87,5 мг/л) (объем геля: объем раствора = 1 : 5,5). Формальдегид следует добавлять к раствору непосредственно перед употреблением. Через 10 мин гель извлекают из восстанавливающего раствора и помещают в раствор, усиливающий цветность. Цветная окраска развивается по мере диффузии соды в гель в течение нескольких часов. Мак-

симальная интенсивность окраски достигается за 6 ч. С помощью этого метода полипептидные зоны окрашиваются четырьмя основными цветами: синим, зеленым, желтым и красным. Пока еще неясно, чем определяется цвет — длиной полипептида, аминокислотным составом или же и тем и другим. Анализ картины окрашивания в публикации Sammons et al., 1981 (рис. 4), полученный при двумерном фракционировании белков тромбоцитов, наводит на мысль, что зеленый цвет соответствует оснóвным, относительно низкомолекулярным полипептидам, однако для окончательного вывода необходимы дополнительные эксперименты. Набор реактивов для окрашивания по этой методике поставляется под маркой Gelcode американской фирмой Upjohn Diagnostics (Kalamazoo, MI).

Мне хотелось бы сделать еще несколько замечаний по поводу метода окрашивания серебром. Механизм окрашивания до сих пор окончательно не установлен. Вероятно, основным центром связывания серебра в белках является амидогруппа пептидной связи. Известно, что при реакции с ионами серебра в кислой среде амидные протоны могут замещаться на эквивалентное количество металла. Кроме того, в нейтральных и щелочных растворах, содержащих какие-либо восстанавливающие агенты (например, альдегиды), ионы серебра могут восстанавливаться с образованием осадка металлического серебра. Поэтому при окрашивании, как правило, используются растворы, содержащие формальдегид. По этой же причине одна из первых методик окрашивания (Oakley et al., 1980), на первой стадии которой применялась фиксация белков глутаровым альдегидом, отличалась слишком интенсивным фоновым окрашиванием. Она была подвергнута критике в работе Boulikas, Hancock, 1981, где также отмечалось, что предварительная обработка глутаровым альдегидом сенсибилизирует поверхность геля на участках, примыкающих к белковым зонам, и развитие окраски происходит слишком быстро — настолько, что становится практически неконтролируемым. Невероятно высокую чувствительность метода окрашивания серебром, намного превосходящую уровень чувствительности обычного колориметрического анализа, можно объяснить процессом спонтанного роста кристаллов на затравках, образовавшихся первоначально на белковой зоне (Switzer et al., 1979), т. е. реализацией, по сути дела, такого же механизма амплификации, что и при проявлении экспонированной фотоэмульсии.

Недавно была описана еще одна модификация метода, основанная на применении метиламина вместо аммиака в растворе нитрата серебра, а также на принципе «переэкспонирования» с последующим ослаблением до желаемой интенсивности окрашивания (Marshall, Latner, 1981). По утверждению авторов,

это позволяет еще более повысить интенсивность окрашивания и избежать возникновения так называемых «полых» пятен. Образование отдельных «полых» пятен, или колец, наблюдается, например, при окрашивании по методу Sammons et al., 1981, при содержании белка более 0,5 мкг на зону. В этом случае окрашиваются преимущественно края, а центр пятна остается практически неокрашенным, что вызывает появление ложных двойных пиков при сканировании (Görg, Righetti, неопубликованные данные).

Не так давно метод окрашивания серебром удалось применить и для детектирования нуклеиновых кислот (Boulikas, Hancock, 1981). Этот метод оказался примерно в 20 раз чувствительнее традиционного метода детектирования с помощью бромистого этидия; он позволяет регистрировать до 0,6 нг ДНК на зону.

Применение метода окрашивания серебром при ИЭФ и двумерном фракционировании белков рассматривается в работах Allen, 1980; Merril et al., 1979, и Görg et al., 1981. По-видимому, пока еще рано безоговорочно заявлять о полном триумфе этого метода; по крайней мере, судя по результатам исследования Poehling, Neuhoff, 1981, при его использовании следует проявлять определенную осторожность. Эти авторы пишут следующее: «Процесс оптимального окрашивания серебром — это шаткий компромисс между осаждением серебра на белке и развитием фонового окрашивания. Для разработки воспроизводимой методики окрашивания необходима тщательная эмпирическая стандартизация множества операций. На сегодняшний день метод окрашивания серебром (в отличие от СВВ) не позволяет добиться стехиометрического окрашивания белков. Не наблюдается прямой зависимости между интенсивностью окраски и содержанием белка в зоне. Чувствительность метода сильно зависит от конкретного вида белка и нелинейно зависит от концентрации». Впрочем, такой взгляд на метод оспаривается в работе Merril et al., 1982. Критический разбор шести вариантов методики окрашивания серебром дается в работе Ochs et al., 1981.

3.3.3. Денситометрирование сфокусированных зон

Цилиндрические гели, используемые для ИЭФ, по размеру, как правило, подходят к обычным сканирующим устройствам в большинстве моделей спектрофотометров. Для денситометрической оценки содержания белка в сфокусированных зонах используется такое же оборудование, что и в случае обычного диск-электрофореза в геле. После ИЭФ в аппарате, описанном в работе Righetti, Drysdale, 1971, гели можно сканировать в

10-см кювете регистрирующего спектрофотометра фирмы Gilford (модель 240), который снабжен системой линейного перемещения кюветы. Стандартные кварцевые или стеклянные трубки с гелем можно закрепить прямо в кюветодержателе и проводить сканирование, не извлекая гелей из трубок. В работе Fawcett, 1970, для сканирования гелей при постоянной длине волны, а также для получения спектров отдельных компонентов использовался спектрофотометр Amicon SP 800. Была предложена система сканирования, позволяющая контролировать процесс разделения непосредственно в ходе ИЭФ в градиенте плотности (Castimpoolas, 1973c). При этом ИЭФ проводилось прямо в вертикальной кварцевой кювете, закрепленной в кюветодержателе модифицированного сканирующего устройства спектрофотометра фирмы Gilford. Благодаря непрерывному сканированию можно проследить за миграцией белков на всех этапах фракционирования. Эта система позволяет получить наиболее достоверную картину разделения при аналитическом ИЭФ в сахарозном градиенте плотности, поскольку дает возможность зарегистрировать близкие пики, которые в процессе элюции могли бы перекрыться. Сканирование в ходе ИЭФ помогает также точно определить момент достижения равновесия, что весьма существенно для предотвращения дестабилизации градиента pH при слишком продолжительном электролизе (за счет катодного дрейфа; Righetti, Drysdale, 1971, 1973).

Для денситометрирования после ИЭФ в плоском слое геля в работе Radola, 1973b, использовался спектрофотометр SD 3000 фирмы Schoeffel Instruments (Westwood, NJ, USA). Для сканирования цилиндрических и плоских гелей, слоев гранулированного геля, ацетилцеллюлозных мембран и бумажных реплик (размером до 20×20 см) в режиме регистрации проходящего или отраженного света, а также флуоресценции может использоваться спектрофотометр фирмы Zeiss (модель MPQ II, предназначенная для хроматографического анализа). Этот сканирующий спектрофотометр может применяться и для получения спектров индивидуальных сфокусированных зон. Описано устройство, позволяющее с помощью спектрофотометра Beckman DH проводить сканирование после ИЭФ в 2-мм слое сефадекса G-200 (Holmquist, Broström, 1979). Это позволяет регистрировать сфокусированные зоны без применения бумажных реплик.

Лимитирующим фактором при денситометрировании окрашенных белковых зон является разрешающая способность сканирующего устройства. Абсолютную разрешающую способность при сканировании можно определить как минимальное расстояние между двумя дискретными пиками, которое еще может быть зарегистрировано в виде четкого минимума, доходящего до базовой линии. По этому критерию самые совершенные скани-

рующие устройства характеризуются предельным разрешением 230 мкм. Иначе говоря, для того чтобы перо самописца достигало базовой линии в интервале между пиками, протяженность этого интервала должна быть не меньше 230 мкм. Фактически же в большинстве сканирующих устройств предел разрешения пиков значительно выше — около 1 мм и более.

Разрешающую способность можно было бы повысить за счет сужения щели спектрофотометра. Однако, как утверждается в работе Zeineh et al., 1975, при ширине щели менее 100 мкм разрешение не только не повышается, но становится более низким из-за расхождения пучка света после прохождения через такую узкую щель. Другая проблема, возникающая при использовании очень узкой щели, особенно в УФ-области, связана с тем, что при этом становится слишком малой энергия пучка света и соответственно снижается чувствительность детектирования. Таким образом, доступные в настоящее время сканирующие устройства по разрешающей способности не соответствуют потребностям ИЭФ, для которого — особенно в случае использования тонких гелей — уровень разрешения при сканировании часто должен достигать 50 мкм.

Для решения этой проблемы в работе Zeineh et al., 1975, был использован лазерный сканирующий денситометр с мягким излучением. В этом приборе сканирование проводится с помощью монохроматического когерентного пучка света, поляризованного в плоскости щели, с длиной волны 633 нм. Такое денситометрирование в красном свете эффективно при регистрации белковых зон, окрашенных кумасси, или зон иммунопреципитации, а также для нефелометрии. В то же время белковые зоны, окрашенные с помощью Ponceau S или других красных красителей, при работе на этой длине волны окажутся прозрачными. Выпускается также УФ-лазер с мягким излучением для регистрации белковых зон по флуоресценции или поглощению при 320 нм. Эта модель лазерного сканирующего устройства отличается от других тем, что ширина пучка в ней не регулируется вручную с помощью щели, а контролируется автоматической внутренней подстройкой. Это позволяет регистрировать микроскопические зоны (пятна) шириной всего лишь 3—10 мкм. Отсутствие щели снимает проблемы, связанные с интерференцией, и сводит к минимуму геометрические искажения, возникающие, как правило, при сканировании цилиндрических гелей. Сканирование с помощью лазерного микропучка позволяет получить картину разделения в виде набора правильных гауссовых кривых даже при регистрации искаженных зигзагоподобных или дугообразных зон. Благодаря использованию очень узкого пучка даже близко расположенные зоны регистрируются самописцем в виде четко разрешенных пиков. Так, полное раз-

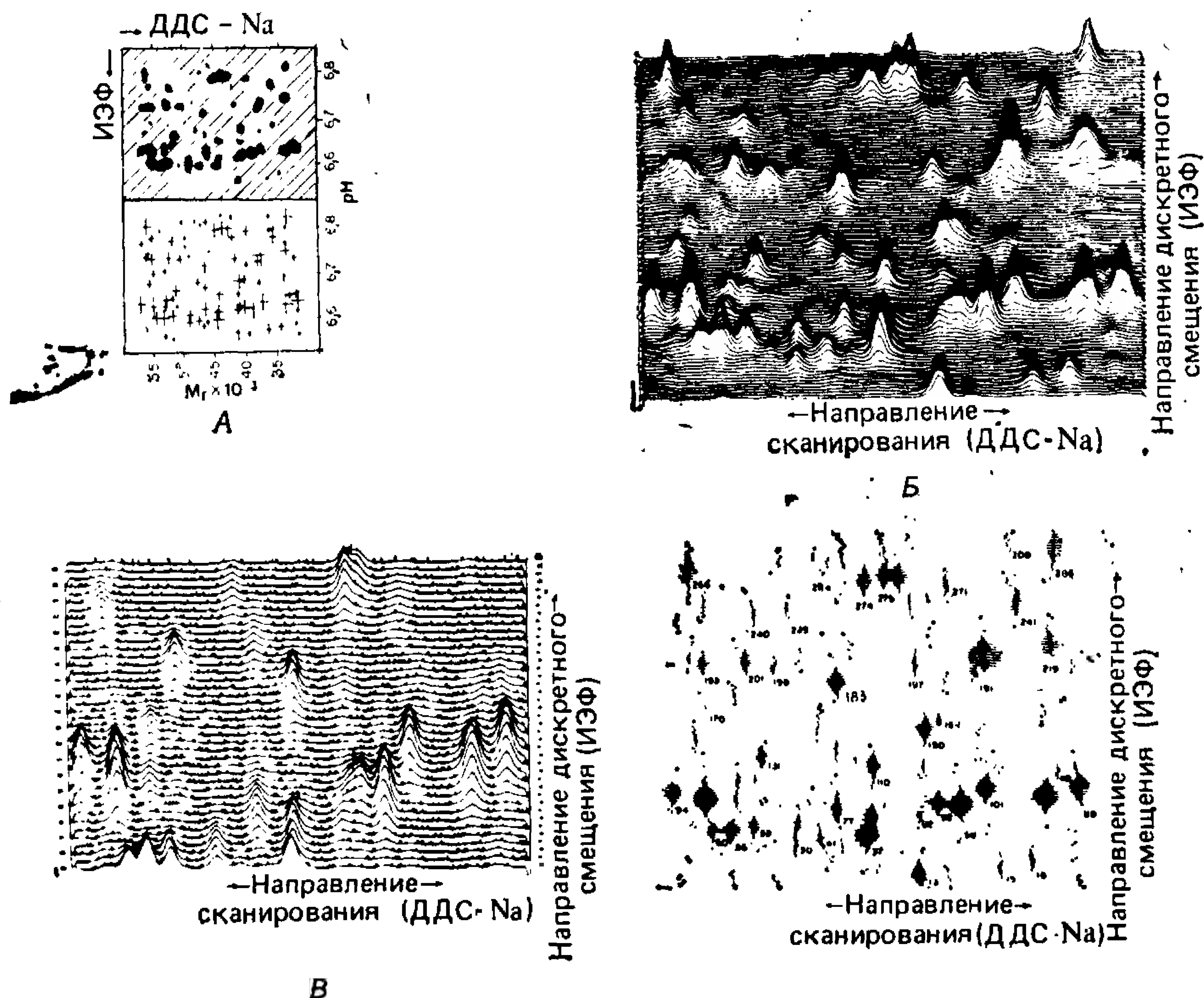


Рис. 3.22. Один из вариантов компьютерного анализа двумерных электрофореграмм. *А*. Флюорограмма геля после двумерного фракционирования меченых белков конфлюэнтной культуры клеток В 103. В первом направлении проводилось ИЭФ в диапазоне pH 6—8, во втором — электрофорез в ДДС-Na в 7,5%-ном ПААГ. Для упрощения картины проиллюстрирован процесс обработки небольшого участка геля размером 36×53 мм, обычио же сканируют площадь 150×150 мм. Минимальное необходимое для регистрации содержание радиоактивного материала в пятне — 0,5 имп./мин. На изображении, полученном при первичной машинной обработке, белковые пятна представлены в виде крестов, размер которых в каждом случае пропорционален суммарному поглощению в индивидуальном пятне. *Б*. Линии, полученные при последовательном сканировании изображения на рис. *А*. Каждая линия строится по данным примерно 380 независимых измерений поглощения, которые поступают на ЭВМ и обрабатываются непосредственно на стадии анализа линий. Расстояние между линиями соответствует шагу в 280 мкм в направлении дискретного смещения луча сканирующего устройства (по оси pH). *В*. Анализ линий. По заданной программе на каждой линии делаются специальные пометки, указывающие, каким образом проводилась обработка данных. Каждый пик заключается в скобки, центр пика помечается вертикальной чертой. Показаны линии 20—59 с рис. *Б*, разнесенные на большее расстояние друг от друга. *Г*. Преобразование в дискретные зоны. Пики, зарегистрированные при анализе линий, трансформируются в дискретные зоны, образуемые небольшими параллельными отрезками соответствующих линий. Длина каждого отрезка пропорциональна интенсивности на данном участке пика. Центр отрезков помечен вертикальной чертой, касающейся следующего параллельного отрезка, так что все отрезки, входящие в данную дискретную зону, оказываются объединенными общей центральной линией. Пронумерованные зоны затем интегрируются в пики суммарной интенсивности, площадь каждого из которых рассчитывается на завершающем этапе обработки (не показано). (Garrels, 1979.)

решение двух соседних зон может достигаться при расстоянии между ними всего лишь 80 мкм. Как утверждается в работе Zeineh et al., 1975, при необходимости разрешающую способность современных сканирующих лазеров можно повысить с помощью некоторых модификаций до нескольких сотен ангстрем. В настоящее время одно из лазерных сканирующих устройств выпускается фирмой LKB Produkter AB (2202 Ultro Scan).

При двумерном разделении белков (аналогично методу О'Фаррелла) денситометрирование гелей оказывается нелегкой задачей. В этом случае каждое белковое пятно должно характеризоваться тремя параметрами — pI (координатой по оси x), M_r (координатой по оси y) и относительной интенсивностью (в %). Пожалуй, эта задача лишь ненамного легче, чем составление астрономических карт, которое требует введения четвертой координаты. На рубеже веков гарвардский астроном Пикеринг решал подобную задачу с помощью наемных «компьютеров» (Ferris, 1979). Он платил по 25 центов в час женщинам, которые должны были усердно покрывать чистые страницы журналов многочисленными колонками цифр. Ошибаться не позволялось! Сегодня, в условиях расцвета феминистского движения и широкого использования ЭВМ, такой подход к проблеме показался бы, мягко говоря, экстравагантным. Программы для регистрации и анализа результатов двумерного фракционирования в геле с помощью компьютера были независимо предложены несколькими группами исследователей (Garrells, 1979; Bossinger et al., 1979; Kronberg et al., 1980; Taylor et al., 1980; Lutin et al., 1977; Alexander et al., 1980; Capel et al., 1979; Klose et al., 1980). На рис. 3.22 в качестве примера приведен один из вариантов компьютерного анализа картины двумерного разделения белков в геле. Белковые пятна на флюорограмме, радиоавтограмме или электрофореграмме, окрашенной кумасси синим, преобразуются в кресты (*А*), размер которых пропорционален суммарной интенсивности данного пятна. Эти кресты в свою очередь трансформируются в «силовые линии» сканирования (*Б*), которые при прохождении через область креста образуют пики. Далее следуют этапы анализа «силовых линий» (*В*) и преобразования их в дискретные зоны (*Г*). После интегрального анализа интенсивности дискретных зон получают денситограммы (на рис. не показаны), по форме записи аналогичные тем, которые получаются при сканировании обычных (одномерных) гелей.

3.3.4. Радиоавтография и флюорография

Введение радиоактивной метки в белки можно осуществить или биосинтетически с использованием меченых аминокислот, или искусственным путем — с помощью реакций иодирования

(Samols, Williams, 1961) или восстановительного метилирования (Kumarasamy, Symons, 1979), а при работе с антителами — с использованием радиоактивных гаптенов (Williamson, 1971), меченных радиоактивным иодом антигенов (Keck et al., 1973a,b) и т. п. Для мечения белков можно использовать любые доступные радиоактивные реагенты, которые могут химически модифицировать аминогруппы, SH-группы, имидазольное кольцо, фенольные или алифатические гидроксилы (список подобных реагентов приведен в Приложении II книги Hames, Rickwood, 1981). Многие из реагентов этого типа изменяют суммарный заряд белка, и, чтобы избежать образования артефактных множественных форм, лучше проводить модификацию белков не до, а после ИЭФ.

Для регистрации радиоактивных зон используют один из двух основных экспериментальных подходов. В первом варианте на гель накладывают рентгеновскую пленку, в которой под воздействием радиоактивного излучения из галогенида серебра образуется металлическое серебро. «Засвеченные» участки, соответствующие радиоактивным зонам, можно наблюдать визуально после проявления пленки. Другой подход заключается в разрезании геля на сегменты и определении содержания меченого белка в них с помощью сцинтилляционного счетчика. Этот метод часто применяют для количественного определения белков, особенно при использовании двойной метки. Однако разрешающая способность в этом случае лимитируется шириной сегментов геля, которую, как правило, не удается сделать менее 0,5 мм.

Метод регистрации на рентгеновской пленке применяют в четырех основных вариантах: прямая радиоавтография, флюорография, непрямая радиоавтография и регистрация двойной метки. Рассмотрим вкратце каждый из этих вариантов.

Прямая радиоавтография. Белки, меченные ^{32}P или ^{125}I, можно регистрировать непосредственно во влажных плоских или цилиндрических гелях, помещая их в герметически закрывающийся пакет, на который накладывают рентгеновскую пленку. Разрешение удается заметно повысить, если гель предварительно высушить на листе фильтровальной бумаги (ватман 3ММ; см. разд. 3.2.15). Обычно перед высушиванием гель окрашивают кумасси синим и отмывают от фона. Таким образом, радиоавтограмму удается сопоставить с обычной картиной белкового окрашивания. Для облегчения такого сопоставления удобно пометить бумагу, на которой находится высушенный гель, радиоактивными чернилами ($^{14}C\sim1$ мкКи/мл) в нескольких точках по периметру геля. Рентгеновскую пленку накладывают прямо на окрашенный гель, зажимают в специальной радиоавтографической кассете или просто между двумя стеклян-

ными пластинками с помощью металлических зажимов и помещают в черный пластиковый пакет или в светонепроницаемую коробку. После экспонирования пленку проявляют в соответствии с предписаниями фирмы-изготовителя.

При прямой радиоавтографии (время экспозиции 24 ч) высушенного ПААГ с помощью пленки Kodirex различимые пятна, имеющие $A_{540} \simeq 0{,}02$, удается получить при содержании метки, соответствующем 6000 расп./(мин·см^2) для ^{14}C или ^{35}S, 1600 расп./(мин·см^2) для ^{125}I и 500 расп./(мин·см^2) для ^{32}P (Laskey, Mills, 1975, 1977). Величина поглощения в пятне пропорциональна радиоактивности соответствующей зоны. Таким способом не удается зарегистрировать ^{3}H-метку, поскольку мягкое β-излучение трития не проходит через слой геля. Обнаружить тритиевую метку можно с помощью флюорографии, обладающей, кроме того, большей чувствительностью к излучению ^{14}C и ^{35}S, чем прямая радиоавтография. Разработан также метод так называемой «непрямой» радиоавтографии, позволяющей повысить эффективность регистрации ^{125}I и ^{32}P (Laskey, Mills, 1977). Методические основы флюорографии и непрямой радиоавтографии недавно были рассмотрены в обзоре Laskey, 1980.

Флюорография (для ^{3}H, ^{14}C и ^{35}S). Для флюорографической регистрации метки в гель импрегнируют сцинтиллятор (2,5-дифенилоксазол, или ППО), высушивают, накладывают на него рентгеновскую пленку и экспонируют при −70 °C. При более высоких температурах чувствительность метода заметно понижается. Метод основан на том, что, хотя низкоэнергетические β-частицы, образующиеся при распаде трития, не могут проникнуть через матрицу геля и дойти до пленки, они взаимодействуют с молекулами ППО в геле. При этом энергия радиоактивного распада преобразуется в энергию видимого света, который в свою очередь регистрируется рентгеновской пленкой (чувствительной к синей области спектра). Таким образом, благодаря относительно высокой проникающей способности света удается решить проблемы, связанные с низкой проникающей способностью β-частиц, которые в обычных условиях поглощаются материалом матрицы и образца.

Последовательность основных операций при флюорографической регистрации радиоактивности в геле приведена в табл. 3.6. Метод может применяться в случае как фиксированных и окрашенных, так и нефиксированных гелей. При вымачивании в диметилсульфоксиде (ДМСО) происходит частичная десорбция кумасси синего с белковых зон, так что слабо окрашенные полосы могут в конце концов оказаться совершенно невидимыми. После того как ППО выпадает в осадок, гель становится непрозрачным, а белковые зоны плохо различимыми. Поэтому фотографировать окрашенный гель лучше перед его подготов-

Таблица 3.6. Основные операции при флюорографии гелей (Hames, 1981)

1. Сразу после электрофореза или после окрашивания и удаления фона гель в течение 30 мин вымачивают в 20-кратном объеме ДМСО и затем еще 30 мин в свежей порции ДМСО[1]. Эти две порции растворителя можно хранить по отдельности и использовать (в той же последовательности) несколько раз для вымачивания других гелей. Однако многократное использование одного и того же растворителя нежелательно, поскольку, для того чтобы ППО мог эффективно проникать в гель, из него следует удалить практически всю воду.
2. Гель погружают в 4-кратный объем 20%-ного ППО в ДМСО на 3 ч[2].
3. Затем гель переносят на 1 ч в 20-кратный объем воды. При этом ППО, растворимый в ДМСО, но нерастворимый в воде, выпадает в осадок и гель становится непрозрачным.
4. Гель высушивают под вакуумом (разд. 3.2.15)[3].
5. На гель накладывают рентгеновскую пленку, экспонируют при —70 °С. Наиболее чувствительна пленка Kodak X-Omat R, XR1. Если ее нет в наличии, можно применять и несколько менее чувствительную пленку Fuji PX. Неэкранированные рентгеновские пленки Kodirex и Kodak, широко применяемые для радиоавтографии, малочувствительны к видимому свету и поэтому для флюорографии не используются.
6. По окончании экспонирования форму держат в собранном виде, пока она не прогреется до комнатной температуры (во избежание появления вуали), затем пленку вынимают и проявляют обычным способом, согласно соответствующей инструкции.

[1] Для гелей, содержащих менее 2% акриламида в сочетании с 0,5%-ной агарозой, вместо ДМСО используют метанол. После электрофореза гель в течение 30 мин вымачивают в 20 объемах метанола. Затем гель на 3 ч помещают в 10%-ный раствор ППО в метаноле, после чего высушивают под вакуумом без нагревания.

[2] Избыток ППО можно извлечь из оставшегося раствора, добавляя к нему 3 объема 10%-ного этанола. Выпадает осадок, который спустя 10 мин отделяют фильтрованием, промывают 20 объемами воды и высушивают на воздухе.

[3] Растрескивания геля при сушке можно избежать, вымочив его в растворе метанола (до 30%), содержащем 3% глицерина, непосредственно перед высушиванием.

кой к флюорографии. Для сопоставления флюорограммы с обычной картиной окрашивания белков высушенный гель можно по периметру пометить радиоактивными чернилами до наложения рентгеновской пленки. К сожалению, без проведения предварительной специальной обработки рентгеновской пленки интенсивность образующихся при флюорографии пятен оказывается не пропорциональной содержанию метки в соответствующих белковых зонах. При этом зонам с низкой радиоактивностью соответствуют слишком слабые пятна на флюорограмме. Проблема может быть решена благодаря предварительному слабому засвечиванию пленки с помощью яркой короткой световой вспышки (продолжительностью $\leqslant 1$ мс). Методика контролируемого предварительного засвечивания пленки приведена в табл 3.7 (Laskey, Mills, 1975). Такое засвечивание пленки до $A_{540}=0,1$—$0,2$ приводит к тому, что поглощение в пятнах после флюорографии становится пропорциональным радиоактивности образцов, а чувствительность метода по сравнению с прямой

радиоавтографией еще более повышается и достигает 400 расп./(мин·см^2) для ^{14}C или ^{35}S и 8000 расп./(мин·см^2) для ^3H. Следует еще раз подчеркнуть, что только после такого предварительного засвечивания пленки профиль поглощения на флюорограмме соответствует истинному распределению радиоактивности в геле. Поэтому для количественной флюорографии всегда используют пленки, засвеченные до $A_{540} \simeq 0,15$. При более интенсивном засвечивании (выше 0,2 ед. A_{540}) чувствительность пленки при флюорографии ^3H, ^{14}C или ^{35}S становится еще более высокой, однако при этом утрачивается пропорциональность между поглощением и радиоактивностью. В работе Chamberlain, 1979, предлагалось использовать в качестве флюоресцирующего агента салицилат натрия вместо ППО. Важнейшим преимуществом салицилата помимо значительно более низкой стоимости является то, что он растворим в воде. Благодаря этому отпадает необходимость в проведении длительной процедуры вымачивания геля в ДМСО, а затем в воде. При использовании салицилата натрия процесс подготовки геля и флюорографии занимает 0,5 ч вместо обычных пяти. При работе с предварительно засвеченными рентгеновскими пленками чувствительность флюорографии с использованием салицилата, судя по всему, не ниже, чем в случае обычной ДМСО-ППО-системы. Наблю-

Таблица 3.7. Предварительное слабое засвечивание рентгеновской пленки для проведения количественной флюорографии (Hames, 1981)

Предварительное засвечивание проводят с помощью однократного импульса от электронной «вспышки» типа Vivitar 283. Длительность импульса не должна превышать 1 мс, поскольку более продолжительное экспонирование приводит только к усилению фона (вуали) без дальнейшего повышения чувствительности пленки. Во избежание недоэкспонирования, которое может быть вызвано неполной зарядкой конденсатора, «вспышку» следует включать не ранее чем через 30 с после пробного запуска. Для снижения интенсивности и для рассеяния света на окошке «вспышки» закрепляются соответствующие фильтры.

1. Непосредственно перед окошком помещают инфракрасный фильтр для защиты других фильтров от выделяющегося тепла.
2. Для уменьшения интенсивности света ставят цветной фильтр. Используют оранжевые фильтры фирмы Kodak: Deep Orange, Kodak Wratten № 22 — для сильных «вспышек» типа упомянутой выше или Orange № 21 — для более слабых.
3. Для дополнительного рассеяния света от «вспышки» и, следовательно, для равномерного засвечивания пленки используют лист фильтровальной бумаги (например, ватман № 1). Интенсивность освещения можно немного варьировать, изменяя расстояние между лампой и пленкой (обычно 60—70 см), а также апертуру окошка «вспышки». При засвечивании под пленку подкладывают желтую бумагу. После обработки пленку накладывают засвеченной стороной на гель. Степень засвеченности пленки контролируют с помощью обычного спектрофотометра, сравнивая величину ее фонового поглощения при 540 нм с поглощением необработанной пленки. Предварительно засвеченная пленка не подлежит длительному хранению.

дается аналогичная линейная зависимость между поглощением пятен на флюорограмме и радиоактивностью в соответствующих зонах. Был предложен и еще один вариант обработки геля — вымачивание в растворе ППО, приготовленном в ледяной уксусной кислоте (Pulleyblank, Booth, 1981). Этот метод можно использовать при работе как с полиакриламидными, так и с агарозными матрицами (ДМСО растворяет агарозный гель!). Кроме того, в отличие от вымачивания в ДМСО, обработка уксусной кислотой не приводит к обесцвечиванию белковых зон, окрашенных кумасси синим. Окраска белка не влияет на чувствительность флюорографии, поскольку спектр поглощения окрашенных белков (красная область) не перекрывается со спектром испускания ППО (синяя область).

Непрямая радиоавтография (для ^{32}P или ^{125}I). Метод заключается в том, что после наложения предварительно засвеченной рентгеновской пленки на гель (влажный или высушенный, окрашенный или нет) эту пленку сверху закрывают интенсифицирующим экраном из вольфрамата кальция и экспонируют при −70 °C (Laskey, Mills, 1977). Излучение частично поглощается пленкой и дает обычную радиоавтографическую картину, а частично проходит через пленку и более эффективно поглощается экраном. Это порождает интенсивное ответное свечение материала экрана, которое в свою очередь поглощается пленкой и значительно интенсифицирует радиоавтографическую картину.

Разрешающая способность такого метода по сравнению с прямой радиоавтографией снижается лишь ненамного, а чувствительность повышается весьма существенно. Так, при использовании пленки X-Omat R (Kodak), засвеченной до $A_{540}=0{,}15$, и интенсифицирующего экрана типа Fuji Mach II или Dupont Cronex Lightning Plus эффективность регистрации для ^{32}P повышается в 10,5 раза, а для ^{125}I — в 16 раз по сравнению с обычной радиоавтографией. Это означает, что при содержании метки, отвечающей 50 расп. (^{32}P)/(мин·см^2) или 100 расп. (^{125}I)/(мин·см^2), наблюдается заметное почернение пленки после проявления. При непрямой радиоавтографии сохраняется линейное соотношение между радиоактивностью и поглощением пятна на радиоавтограмме, что позволяет проводить количественное определение метки. Большое значение имеет правильный выбор экрана (его можно использовать многократно). Наилучшие результаты удается получить с помощью упомянутых выше экранов Fuji Mach II и Dupont Lightning Plus. Данные об эффективности использования экранов других марок содержатся в работе Laskey, Mills, 1977.

Регистрация двойной метки с помощью рентгеновской пленки. Интересный метод, особенно эффективный при сравнении двумерных белковых карт двух разных тканей или клеточных ли-

ний, был предложен в работе Choo et al., 1980. Две клеточные линии выращивают в присутствии двух разных изотопов, например ^{14}C и ^{3}H, экстракты смешивают и анализируют в одном и том же двумерном геле. После фиксирования и импрегнирования ППО гель высушивают и проводят флюорографию, как было описано выше. Пятна на флюорограмме образуются за счет совместного действия фотонов, порождаемых распадом ядер ^{14}C и ^{3}H. После этого гель закрывают плотной черной бумагой, которая задерживает как фотоны, так и мягкое β-излучение трития, и проводят радиоавтографию. На полученной таким образом радиоавтограмме проявляются только пятна, порождаемые более жестким β-излучением от ^{14}C. Сравнение флюорограммы и радиоавтограммы позволяет сопоставить наборы генных продуктов различных клеточных линий.

Аналогичные методики были описаны в работах McConkey, 1979, и Walton et al., 1979. Наконец, была разработана еще одна методика, основанная на применении цветной негативной пленки (Kronenberg, 1979). Эта пленка покрыта тремя слоями фотографической эмульсии, каждый из которых чувствителен к одному из трех дополнительных цветов — красному, зеленому или синему. Глубина проникновения излучения в толщу желатиновой эмульсии зависит от энергии испускаемого излучения. Таким образом, в зависимости от проникающей способности излучения разные цветочувствительные слои экспонируются в неодинаковой степени, что соответствует проявлению пятен с разной окраской.

При достаточно высокой радиоактивности в геле его можно анализировать в искровой камере типа Radiochromatogramm Camera, модель 2105 фирмы LKB, или аналогичной камере фирмы Birchover Instruments Ltd. Недавно было продемонстрировано, что традиционные сканирующие устройства для обнаружения радиоактивности в тонком слое, типа Packard Radiochromatogram Scanner, подходят и для сканирования тонких полиакриламидных гелей, содержащих образцы с достаточно высокой радиоактивностью (обычно не менее 0,4 мкКи на зону) (Righetti, Chrambach, 1978; Magnusson, Jackiw, 1979). Для количественного определения меченых белков после ИЭФ по-прежнему наиболее широко применяется метод разрезания геля на сегменты, солюбилизации их содержимого и определения радиоактивности с помощью сцинтилляционного счетчика. Весьма удобный метод разделения цилиндрических гелей на фракции описан в работе Bagshaw et al., 1973. В качестве трубки для полимеризации геля используют цилиндр от тонкого пластикового шприца. После ИЭФ на шприц надевают иглу (№ 20) с обрезанным кончиком, сверху гель закрывают резиновой прокладкой. С помощью дозатора типа Hamilton Repeating Dispen-

сег, управляющего ходом плунжера, содержимое шприца выдавливают через иглу порциями по 10 мкл. Сцепление полиакриламида со стенками пластикового шприца минимальное, благодаря чему при таком фракционировании геля белковые зоны почти не искажаются. Помимо этого способа для фракционирования цилиндрических гелей пользуются устройствами типа яйцерезки (Heiderman, 1965; Chrambach, 1966) или блоком с установленными в ряд бритвенными лезвиями (Matsumura, Noda, 1973). Описано приспособление для разрезания гелей с помощью ирисовой диафрагмы (Peterson et al., 1974). Оно позволяет разрезать гель на сегменты с точностью 13—34% без замораживания или какой-либо другой предварительной обработки. По-видимому, некоторые из упомянутых устройств (во всяком случае, первого и второго типа) с небольшими модификациями можно использовать и для разрезания плоских гелей. После разрезания геля максимальная эффективность счета радиоактивности достигается только при полной элюции белков из геля. Для солюбилизации полиакриламидных гелей, сшитых бис, используют перекись водорода (Goodman, Matzura, 1971). Гели на основе ЭДА разжижаются при щелочной обработке (Paus, 1971), а гели на основе БАЦ — под действием меркаптоэтанола (Hansen et al., 1980) (см. также разд. 3.2.3). Напомним еще раз, что для сшивания гелей не следует пользоваться ДАТД, поскольку он является ингибитором полимеризации.

3.3.5. Иммунологические методы

Методы, основанные на последовательном проведении ИЭФ и какого-либо из вариантов иммуноэлектрофореза, так же как и другие виды двумерного фракционирования, описаны в разд. 3.4.1. Здесь же мы рассмотрим применение метода иммунодиффузии после ИЭФ, который можно считать одним из способов обнаружения сфокусированных белковых зон. Регистрацию белков с помощью иммунопреципитации специфическими антителами лучше всего проводить после ИЭФ в небольших цилиндрических гелях диаметром около 1 мм, что позволяет свести к минимуму расход соответствующей антисыворотки. По окончании ИЭФ гель погружают в пробирку, содержащую необходимый объем раствора антисыворотки. Иммунодиффузия протекает в течение нескольких часов (Carrel et al., 1969). Линии преципитации проявляются в виде опалесцирующих колец на поверхности геля. Полиакриламидная матрица, судя по всему, не препятствует образованию специфических комплексов антиген — антитело. Вероятно, это объясняется тем, что бóльшая часть белка оказывается сконцентрированной близко к поверхности трубки при довольно низком его содержании в центре

зоны. Это создает благоприятные условия для протекания перекрестной реакции с антителами.

В другом варианте гель разрезают на сегменты, которые измельчают и переносят в лунки, проделанные в пластине агарового геля. В центральную лунку заливают антисыворотку и проводят иммунодиффузию в течение 48 ч (секционное иммуноэлектрофокусирование по Catsimpoolas, 1969b). В пластину агарового геля можно поместить и неразрезанный столбик полиакриламидного геля. Для этого в пластине параллельно столбику вырезают щели, в которые заливают соответствующую антисыворотку (Spragg et al., 1973). После ИЭФ в тонком плоском геле пластину ПААГ можно покрыть полосками фильтровальной бумаги, смоченными раствором соответствующих антител (Cotton, Milstein, 1973). Кроме того, полоску ПААГ можно поместить в пластину агарового геля между двумя параллельными щелями, заполненными антисывороткой (Dewar, Latner, 1970). Более совершенный метод непрямой иммунофиксации заключается в том, что на пластину геля после ИЭФ накладывают полоску ацетилцеллюлозной пленки, импрегнированную раствором специфических антител. Этот метод использовался для регистрации фенотипических вариантов α_1-антитрипсина (Arnaud et al., 1977) и различных сывороточных белков (Johnson, 1978). В работе Stibler, 1979, предложена методика прямой иммунофиксации для регистрации белков спинномозговой жидкости и сыворотки. После ИЭФ соответствующий объем антисыворотки распределяли прямо по поверхности геля над треком, в котором происходила миграция данного белка. Эта методика проста в исполнении, однако требует значительного расхода антисыворотки.

Были предложены и другие иммунологические методы детектирования. Так, сфокусированные антигены можно обнаружить, обрабатывая гель раствором антител, а затем инкубируя его в растворе, содержащем антииммуноглобулин G, «сшитый» с пероксидазой из хрена (Olden, Yamada, 1977). При последующей инкубации с перекисью водорода и 3,3′-диаминобензидином комплексы антиген—антитело—пероксидаза проявляются в виде окрашенных зон. Антигены можно также обнаружить с помощью радиоавтографии после обработки геля радиоактивными антителами. В «методе двух антител» лучше использовать меченые вторичные антитела. Вместо вторичных антител можно использовать меченный ^{125}I белок A из *Staphylococcus aureus* (он связывается с константными Fc-участками молекул IgG) (Burridge, 1978). Для получения удовлетворительного отношения радиоактивности в зонах к фоновой радиоактивности гель следует тщательно отмывать от избытка метки. Многообещающей модификацией метода является вариант с получением

реплики с геля на диазобензилоксиметил (ДБМ-)-бумагу. Белки частично переходят на ДБМ-бумагу и связываются с ней ковалентно (Renart et al., 1979). Для регистрации определенных антигенов реплику последовательно обрабатывают первичными специфическими антителами, а затем меченным ^{125}I белком А из *S. aureus*. Последующая радиоавтография выявляет соответствующие белковые зоны. Антитела и белок А удаляют с бумаги обработкой мочевиной и меркаптоэтанолом. После этого реплику можно использовать для дальнейшего тестирования с помощью антител с иной специфичностью.

3.3.6. Специфические методы окраски и метод зимограмм

Большинство специфических красителей, используемых для регистрации белков определенного типа после электрофореза в геле, можно с таким же успехом применять и после ИЭФ в геле. Специфичность некоторых из этих красителей определяется присутствием в белке какого-либо кофактора — металла или простетической группы, например гема, а также других компонентов — углеводов, липидов и т. д. Применение других специфических методов регистрации белков основано на их биологической активности. Ниже приведены отдельные примеры, иллюстрирующие возможности применения различных специфических методов окрашивания.

Гистохимическое окрашивание. Для обнаружения связанных с белком компонентов небелковой природы нередко удается использовать специфические красители. В случае металлосодержащих белков, таких, как трансферрин (Latner, 1973), церулоплазмин (Latner, 1973) или ферритин (Drysdale, 1970), белковые зоны можно локализовать по специфической цветной реакции на ион металла. Кроме того, белки, содержащие ионы металлов, можно обнаружить с помощью метода нейтронной активации. Для этого образец в запаянной ампуле из высокоочищенного кварцевого стекла помещают в реактор и облучают тепловыми нейтронами. Интенсивность γ-излучения образующихся долгоживущих радионуклидов определяют с помощью детектора Geli (фирмы Ortec), соединенного с многоканальным анализатором (Intertechnique). Этот метод был использован для определения связанных с сывороточными белками микроэлементов, таких, как селен, хром, цинк, кадмий, железо, кобальт и сурьма (Schmelzer, Behne, 1975). С помощью специфических методов окраски можно обнаружить белки, содержащие такие кофакторы или простетические группы, как гем или производные флавина. Дополнительные возможности окрашивания появляются при работе со сложными белками. Так, липопротеины, как и обычные липиды, можно обнаружить с помощью краси-

теля Sudan black B (Kostner et al., 1969), а гликопротеины — с помощью типичного для углеводов метода окрашивания, основанного на окислении иодной кислотой с последующим образованием шиффовых оснований, без предварительного удаления амфолитов (Catsimpoolas, Mayer, 1969). Белки, образующие специфический комплекс с определенными лигандами, выявляются посредством инкубации геля после ИЭФ в растворе соответствующего радиоактивного лиганда. Так, конканавалин А можно обнаружить с помощью [α-^{14}C]-метил-D-глюкозида, внутренний фактор Касла из желудочного сока — с помощью [^{14}C]-цианокобаламина, а тироксинсвязывающий белок — с помощью [^{125}I]-тироксина. В работе Keck et al., 1973a, описан интересный способ детектирования иммуноглобулинов. После ИЭФ гель обрабатывают глутаровым альдегидом, при этом образуются межмолекулярные сшивки, благодаря которым сфокусированные зоны фиксируются в геле. Эти зоны удается обнаружить по связыванию с соответствующими антигенами, содержащими радиоактивную или флуоресцентную метку. В табл. 3.8 перечислены некоторые распространенные методы специфического окрашивания, применяемые при ИЭФ.

После ИЭФ многие белки удается обнаружить по их биологической активности. По многим критериям можно считать, что ИЭФ является одним из самых щадящих методов фракционирования ферментов. Хотя разделение проходит в бессолевой среде, присутствующие поливалентные амфолиты-носители оказывают стабилизирующее или защитное действие на большинство белков и помогают удерживать их в растворе. В отдельных случаях стабилизирующее влияние амфолитов оказывается выше, чем у неорганических солей, как это было показано для α-гемолизина, протеазы и гексозаминидазы (Vesterberg et al., 1967). Иногда стабилизация амфолитами бывает обусловлена их хелатирующим эффектом в отношении ионов тяжелых металлов, таких, как Cu^{2+}, Hg^{2+} и Pb^{2+}, которые оказывают ингибирующее действие на некоторые ферменты. Используя соответствующие методы гистохимического окрашивания, удается обнаружить многие ферменты. На рис. 3.23 показан профиль разделения изоферментов лактатдегидрогеназы из тканей сердца курицы. Хотя эти ферменты составляют весьма незначительную часть от суммарного белка тканевых экстрактов, их удается легко зарегистрировать по биологической активности. В данном случае активность ферментов обнаруживалась по восстановлению пиримидиновых нуклеотидов, которым сопровождается процесс ферментативного окисления молочной кислоты. Восстановленные нуклеотиды в свою очередь выявляются благодаря образованию тетразолиевых солей, дающих водонерастворимый окрашенный осадок. Естественно, что в тех случаях, когда pH

Таблица 3.8. Некоторые специфические способы обнаружения образцов в геле после ИЭФ

Образец	Способ обнаружения	Литературный источник
Трансферрин	2,4-динитрозо-1,3-нафталиндиол (Fe^{3+} восстанавливается гидрохиноном)	Latner, 1973
Апотрансферрин	Fe^{3+}-нитрилотриацетат	Hovanessian, Awdeh, 1975
Церулоплазмин	*п*-Фенилендиамин (оксидазная активность)	Latner, 1973
Гаптоглобины	Гемоглобин/бензидин/H_2O_2 (пероксидазная активность)	Latner, 1973
Липопротеины	Краситель Oil Red в 61%-ном этаноле	Latner, 1973
	Краситель Sudan Black B	Kostner et al., 1969 Godolphin, Stinson 1974
Ферритин	Реакция образования берлинской лазури	Drysdale, 1970
Гликопротеины	Окисление периодатом и образование шиффовых оснований (PAS stain)	Hebert, Strobbel, 1974
Иммуноглобулины	Фиксирование глутаровым альдегидом и детектирование с помощью а) ^{125}I-меченых антигенов б) антигенов с флуоресцентной меткой в) меченого белка А из *S. aureus*	Keck et al., 1973a
Негистоновые белки хроматина	Введение метки ^{32}P	McGillivray, Rickwood, 1974
Конканавалин А	α-Метил-D-глюкозид	Akedo et al., 1972
РНК	Толуидиновый синий, метиленовый синий или акридиновый оранжевый	Drysdale, Righetti, 1972
Пептиды	Предварительная окраска динитрофторбензолом	Kopwillem et al., 1973
Гемопексин	Связывание гема	Latner, Emes, 1975
Гепарин	Толуидиновый синий	Nader et al., 1974
Тироксинсвязывающий белок	[^{131}I]-тироксин	Latner, Emes 1975
Внутренний фактор Касла (из желудочного сока)	[^{14}C]-цианокобаламин	Latner, 1973

области фокусирования ферментов значительно отличается от pH-оптимума их каталитического действия, приходится принимать специальные меры для того, чтобы перекрыть буферную емкость амфолитов. Как правило, этого удается достичь, инку-

бируя гель непосредственно с субстратом в концентрированном буферном растворе или проводя быструю предварительную обработку геля буфером с соответствующим значением pH. Поскольку молярность 2%-ных амфолитов в геле составляет в среднем порядка 20 мМ (Righetti, 1980), то, как правило, можно достаточно легко изменить pH с помощью 100—200 мМ буферных растворов. Различные способы изменения неблагоприятного pH в геле после ИЭФ обсуждаются в работах Wadström, Smyth, 1975a, и Gianazza et al., 1980.

В отдельных случаях в процессе ИЭФ может происходить инактивация ферментов за счет хелатирования амфолитами необходимых для активности ионов металлов. Так, было обнаружено, что при продолжительном фокусировании щелочной фосфатазы теряется около 90% активности (Latner et al., 1970), правда, ферментативная активность в значительной степени восстанавливается при последующей инкубации с ионами цинка. Некоторые осложнения при ИЭФ ферментов иногда возникают из-за анодного окисления или катодного восстановления, однако эти проблемы удается разрешить, добавляя соответствующие компоненты к растворам электролитов (разд. 4.2). При ИЭФ в градиенте плотности некоторые антиоксиданты можно вводить непосредственно в рабочий раствор. Однако многие из них ингибируют полимеризацию акриламида, поэтому при ИЭФ в

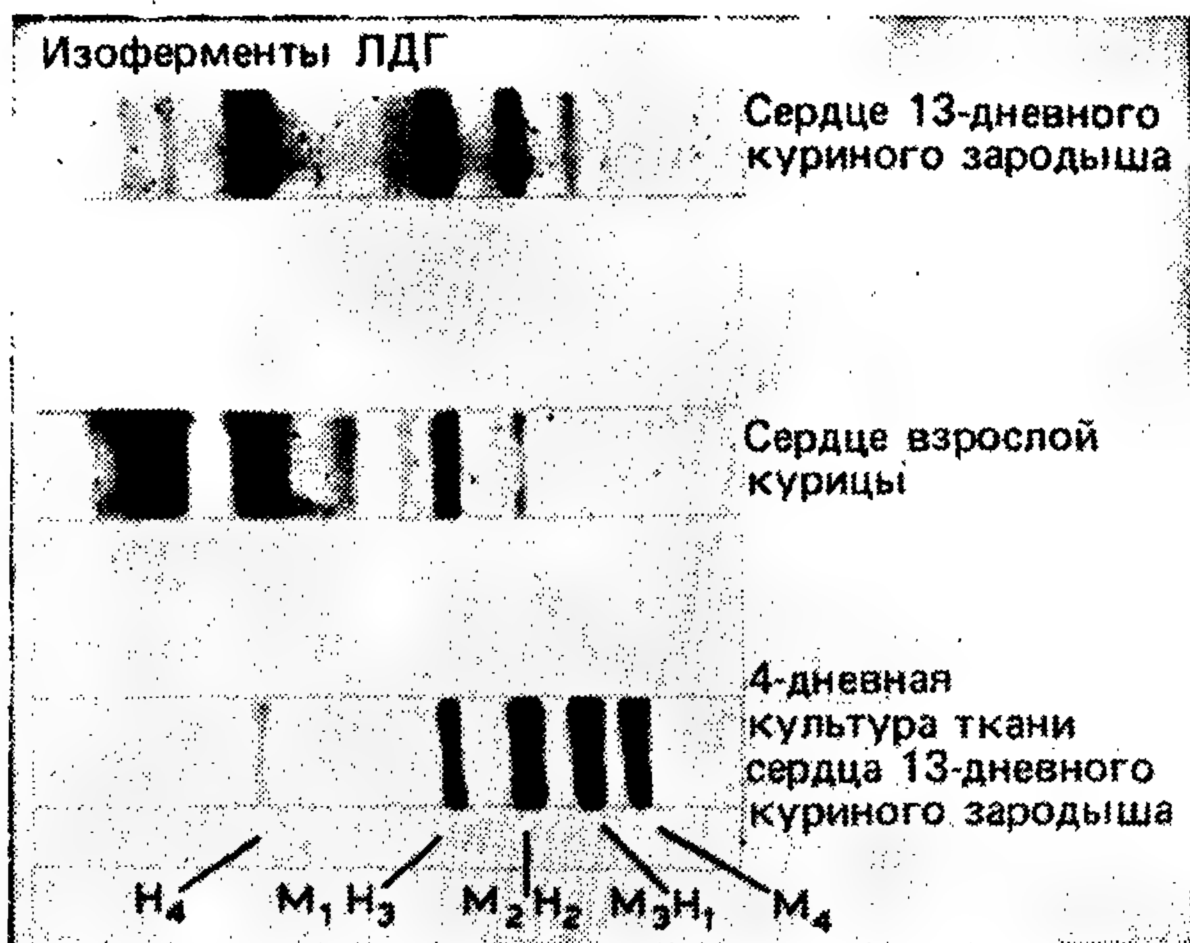


Рис. 3.23. Гистохимическое окрашивание изоферментов лактатдегидрогеназы (ЛДГ) после ИЭФ в цилиндрических гелях фракций надосадочной жидкости неочищенного гомогената тканей сердца курицы. ИЭФ проводилось в диапазоне pH 3,5—10 (Righetti, Drysdale, 1973).

ПААГ их приходится вводить в уже готовый гель или добавлять к электродным растворам.

Помимо методов прямого гистохимического окрашивания с использованием низкомолекулярных реагентов для обнаружения ферментов применяется метод зимограмм. В этом методе на гель после ИЭФ накладывают другой гель, в состав которого могут быть включены высокомолекулярные субстраты и другие реагенты. Метод зимограмм наиболее эффективен при обнаружении белков в плоских гелях. С его помощью удается обнаруживать ряд протеолитических ферментов. Для выявления сфокусированной в плоском геле стафилокиназы использовался сгусток фибрина в смеси с плазминогеном. Стафилокиназа активирует плазминоген в плазмин, благодаря фибринолитическому действию которого в слое непрозрачного сгустка фибрина образуются прозрачные пятна, соответствующие локализации зон стафилокиназы в геле (Vesterberg, Eriksson, 1972). Для выявления стафилококковой протеиназы после ИЭФ использовался агаровый гель, содержащий казеин (Arvidson, Wadström, 1973), а для обнаружения сфокусированного пепсина — агаровый гель, содержащий альбумин (Vesterberg, 1973b). В этих случаях ферментативная активность обнаруживается по появлению прозрачных зон на голубом фоне (рис. 3.24) после обработки агарового геля обычными белковыми красителями (Wadström, Smyth, 1975b). В табл. 3.9 и 3.10 перечислены примеры исполь-

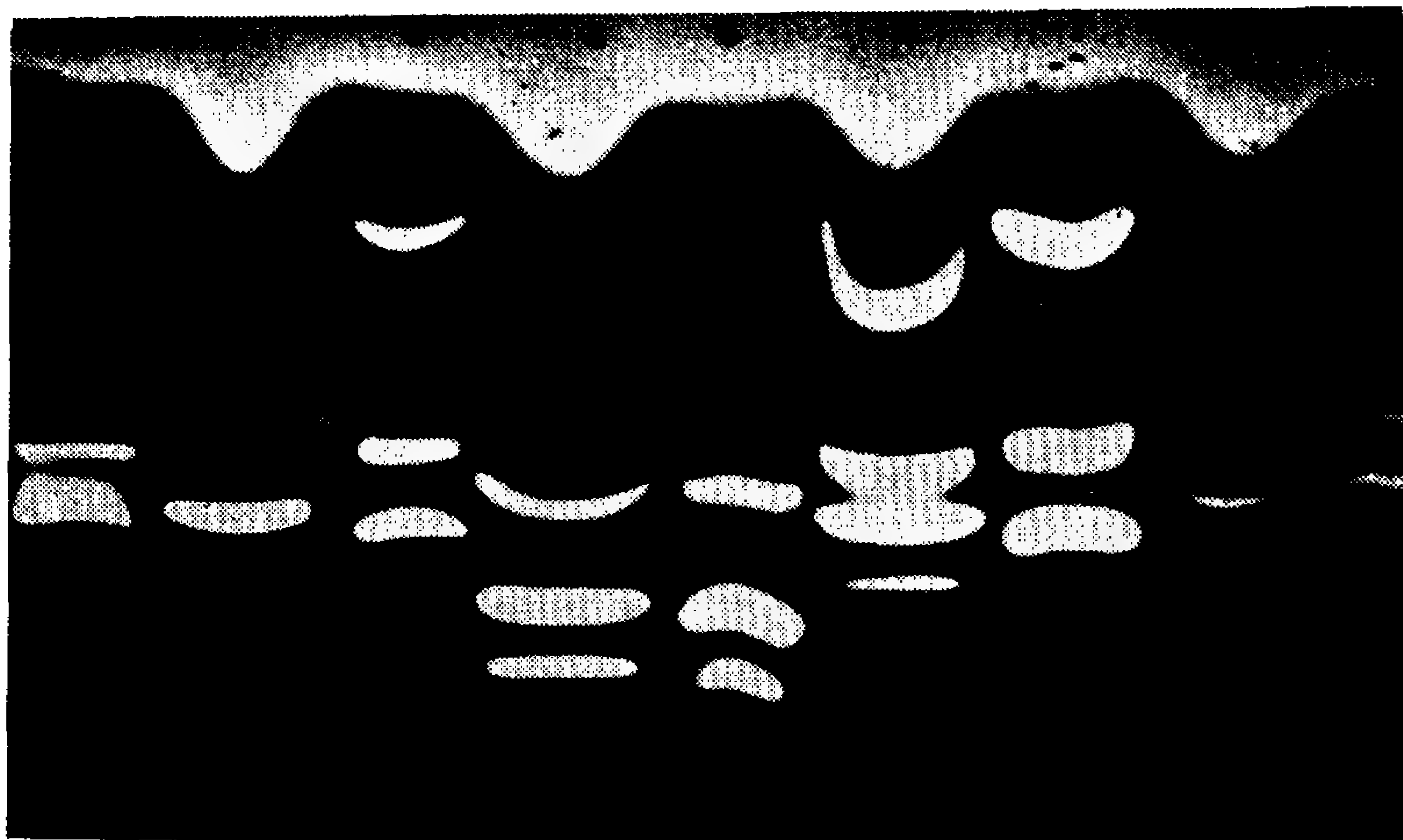


Рис. 3.24. Зимограмма протеиназ из *Serratia liquefaciens* (*S. l.*) и *Serratia marcescens* (*S. m.*) в агаре, содержащем казеин. После ИЭФ в пластине ПААГ на него накладывают пластину казеин-агарового геля. *Слева направо*: *S. l.*, штамм 2; *S. l.*, штамм 3; *S. l.*, штамм 26; *S. m.*, штамм 6; *S. m.*, штамм 7; *S. m.*, штамм 8; *S. m.*, штаммм 10; *S. m.*, штамм 11. (Wadström, Smyth, 1975b.)

Таблица 3.9. Применение метода зимограмм с использованием низкомолекулярных субстратов в сочетании с ИЭФ

Фермент	Субстрат и хромофор	Литературный источник
Алкогольдегидрогеназа	Спирт/NAD/ФМС/МТТ[1]	Harada et al., 1978b
Ацетальдегиддегидрогеназа	Ацетальдегид/NAD/ /ФМС/МТТ	Harada et al., 1978a
β-N-ацетилглюкозаминидаза	Метилумбеллиферил-гликозиды	Leaback, Robinson, 1974
N-ацетил-β-D-гексозаминидаза	Нафтол-AS-BI-N-ацетил-β-D-глюкозамин/ /Быстрый гранатовый GBC, диазониевая соль[2]	Hayase et al., 1973
Галактозо-1-фосфат-уридилтрансфераза	Уридин-5′-дифосфо-1-α-D-глюкопиранозид/ /Галактозо-1-фосфат/ Фосфоглюкомутаза/ /Глюкозо-6-фосфатдегидегрогеназа/NADP	Schapira et al., 1979
Глиоксалаза I	Метилглиоксаль/Глутатион/ДХИФ[3]/МТТ[1]	Kömph et al., 1975; Kühnl et al., 1977a
β-Глюкуронидаза	8-оксихинолин-D-глюкуронид/Быстрый черный K[4], диазониевая соль	Coutelle, 1971
NAD/NADP-дегидрогеназа	Субстрат/NAD-NADP/ /ФМС/Тетразолиевая соль	Humphryes, 1970
NADH-диафораза	NADH/ДХИФ[3]/МТТ[1]	Tariverdian et al., 1970 Edwards et al., 1979; Fisher et al., 1977
Карбоангидраза	4-метилумбеллиферил-ацетат	Haglund, 1971
Катехолоксидаза	4-метилкатехол/*n*-Фенилендиамин	Dubernet, Riberau; Gayon, 1974
Кислая фосфатаза	4-метилумбеллиферил-фосфат	Leaback, Rutter, 1968
Креатинфосфокиназа	Креатинфосфат/ФМС[1]/ /*n*-Нитротетразолиевый голубой[5]	Thorstensson et al., 1975
Лактатдегидрогеназа	Лактат/ФМС/МТТ[1]	Dale, Latner, 1968; Chamoles, Karcher, 1970a, b; Righetti, Drysdale, 1973
Липоксидаза	Линолевая кислота/KI	Castimpoolas, 1969b
Нейраминидаза	2-(3-метоксифенил)-N-ацетилнейраминовая кислота	Groome, Belyavin, 1975
Оксидаза L- и D-аминокислот	L-Leu или D-Phe/ФМС[1]/ /Трифенилтетразолий	Hayes, Wellner, 1969
Пептидаза А	Пептид/Оксидаза L-аминокислот/Аминоэтилкарбазол/Пероксидаза	Kühln et al., 1979b
Пероксидаза[6]	Уреопероксид/Гуайакол или *о*-толуидин и мезидин	Delincée, Radola, 1970, 1971; Rücker, Radola, 1971

Продолжение

Фермент	Субстрат и хромофор	Литературный источник
Прокарбоксипептидаза А	н-Карбо-β-нафтокси-L-Phe/Диазониевый Голубой В[7]/Трипсин	Kim, White, 1971
Супероксиддисмутаза А (индофенолоксидаза)	МТТ/ФМС[1], на свету	Carter et al., 1976; Harris et al., 1974
Ингибитор трипсина и α-химотрипсина	N-ацетил-D, L-Phe-β-нафтиловый эфир/Трипсин/α-химотрипсин	Kaiser et al., 1974
Фосфоглюкомутаза	Глюкозо-1-фосфат/Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа/NADP/ФМС/ /МТТ[1]	Bark et al., 1976; Brinkmann et al., 1972
6-фосфоглюконатдегидрогеназа	6-фосфоглюконат/ /NADP/ФМС/МТТ[1]	
α-L-фукозидаза	4-метилумбеллиферил α-L-фукозид	Omoto, Miyake, 1978
Щелочная фосфатаза	α-Нафтилфосфат/4-аминодифениламиндиазоний сульфат	Righetti, Drysdale, 1971
Щелочная фосфотаза	β-Нафтилфосфат/Быстрый голубой ВВ (соль)[8] или 4-метилумбеллиферилфосфат	Smith et al., 1971
Эстераза	α-Нафтилацетат/Быстрый красный TR (соль)[9]	Bianchi, Stefanelli, 1970
Эстеразы	Нафтилацетат/Быстрый гранатовый GBC, диазониевая соль[2]	Young, Bittar, 1973; Narayanan, Ray, 1977

[1] ФМС — феназинметосульфат; МТТ — 3-(4,5)-диметилтиазолин-2,5-дифенилтетразолий-бромид.
[2] Fast Garnet GBC salt — *о*-аминоазотолуол, диазониевая соль.
[3] ДХИФ — 2,6-дихлориндофенол.
[4] Fast Black K salt — 4-амино-2,5-диметокси-4′-нитроазобензол, диазониевая соль.
[5] Nitroblue tetrazolium — 2,2′-ди-*n*-нитрофенил-5,5′-дифенил-3,3′(3,3′-диметокси-4,4′-дифенилен)дитетразолийхлорид.
[6] Метод реплики на фильтровальной бумаге (Whatman № 1), импрегнированной субстратом в буферном растворе.
[7] Diazo Blue B — тетразотированный *о*-дианизидин.
[8] Fast Blue BB salt — диазотированный 4′-амино-2′,5′-диэтоксибензанилид·$ZnCl_2$.
[9] Fast Red TR salt — толуидиндиазоний·$ZnCl_2$.

зования метода зимограмм для обнаружения различных сфокусированных ферментов с применением низко- и высокомолекулярных субстратов. В табл. 3.11 приведены некоторые общепринятые методики определения ферментов с использованием наложения субстратсодержащих слоев (Wadström, Smyth, 1975a). Вместо наложения агарового слоя можно использовать метод бумажных реплик (Radola, 1973a) или метод отпечатков на

Таблица 3.10. Применение метода зимограмм с использованием высокомолекулярных субстратов в сочетании с ИЭФ (в плоских гелях) (Wadström, Smyth, 1975a)

Фермент	Субстрат	Метод регистрации	Литературный источник
Стафилокиназа[1]	Сгусток фибрина, содержащий плазминоген	Использование субстрата в виде геля	Vesterberg, Eriksson, 1972
Целлюлаза	Карбоксиметилцеллюлоза	Снятие бумажной реплики	Eriksson, Petersson, 1973
α-Амилаза	Крахмал/иод	Получение отпечатка на крахмальной пленке	Beeley et al., 1972
Пепсин	Альбумин/кумасси синий	Иммерсия	Vesterberg, 1973b
Субтилопептидаза, трипсин, δ-химотрипсин, неочищенные бактериальные протеазы	Казеин (не содержащий витаминов)	Наложение агарозного геля с субстратом	Arvidson, Wadström, 1973

[1]) Активатор плазминогена из *Staphylococcus aureus*.

Таблица 3.11. Определение ферментов с помощью наложения агарозных гелей, содержащих соответствующие субстраты и буферные компоненты (Wadström, Smyth, 1975a)

Фермент	Субстрат[1])	Буфер/соли[1])
α-Амилаза	Амилазный тест («Phadebas», Pharmacia) 1 таблетка/10 мл	0,05 М трис-HCl, pH 7,4
Дезоксирибонуклеаза	ДНК из спермы лосося (Koch-Light) или тимуса теленка (Koch-Light), 1%-ный раствор	12,5 мМ $CaCl_2$ и 12,5 мМ $MgCl_2$
Пенициллиназа	0,2%-ный растворимый крахмал (Merck), бензилпенициллин (AB Kabi), 20 мМ раствор Люголя: H_2O=1 : 1	0,1 М KH_2PO_4, pH 5,9
Фосфолипаза С	Лецитин из сои (Sigma), 1,5%-ная эмульсия	0,15 М NaCl в 0,02 М трис-HCl, pH 7,4; 1 мМ $CaCl_2$ и 1 мМ $ZnCl_2$
Протеаза	Девитаминизированный казеин (NBC), 1%-ный раствор, pH 7,4	2 мМ KH_2PO_4 и 1 мМ $CaCl_2$
Стафилококковый гемолизин	Эритроциты человека, кролика или барана (3%)	0,15 М NaCl в 0,02 М трис-HCl, pH 7,4
Эластаза	Эластин (Worthington) 0,5%	0,01 М трис-HCl, pH 8,8

[1]) Приведена конечная концентрация субстратов, буферных компонентов и солей в (1,0—1,5)%-ном агарозном геле.

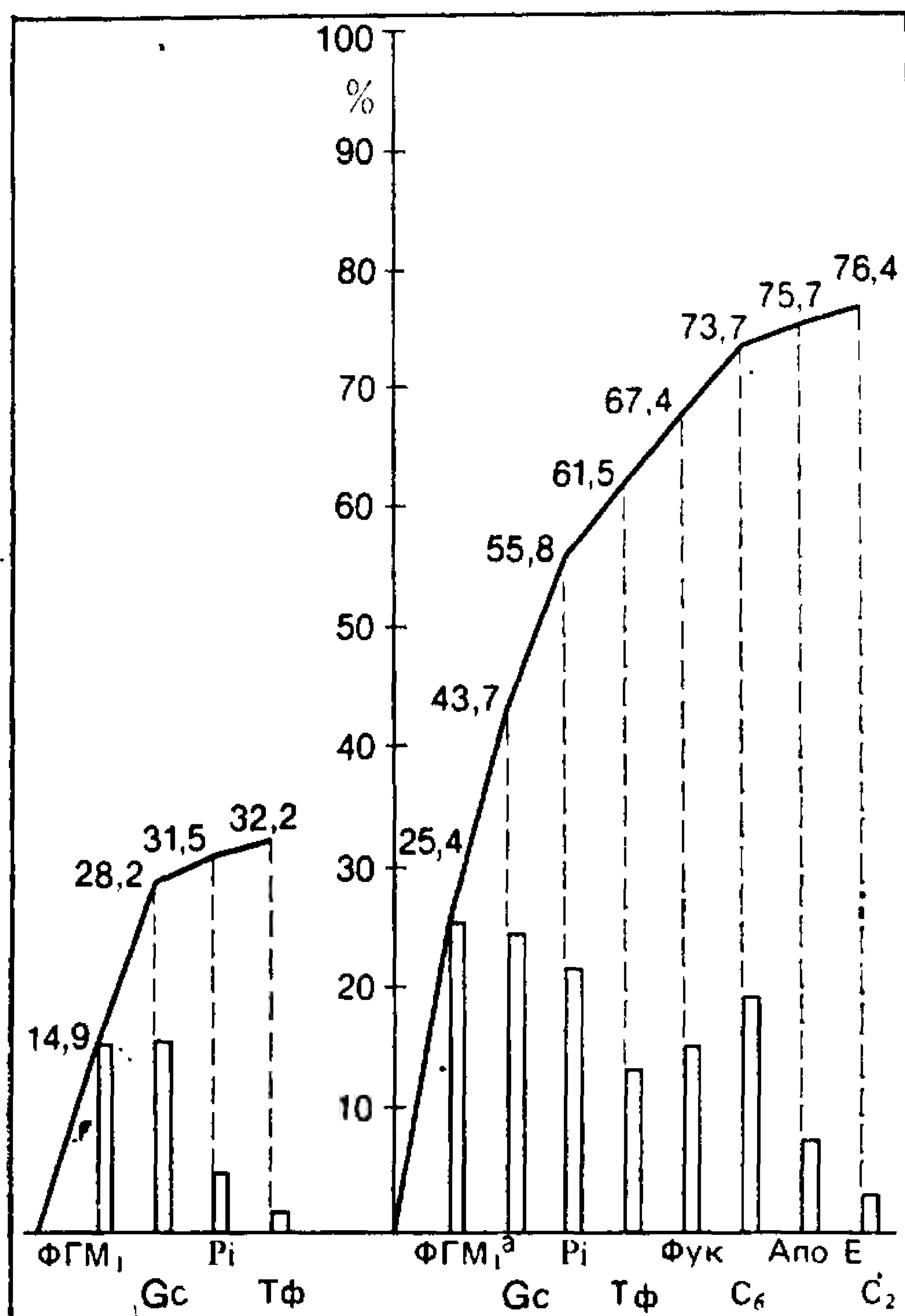


Рис. 3.25. Частота полиморфизма сывороточных белков, выявленная с помощью обычного электрофореза (*слева*) и изоэлектрофокусирования (*справа*). ФГМ — фосфоглюкомутаза; P_i—α_1-антитрипсин; Тф — трансферрин; Gc—Gc-глобулин (группоспецифический компонент); Фук—α-фукозидаза; Апо Е — аполипопротеин Е; C_2 и C_6 — соответствующие компоненты системы комплемента. (Kühnl, 1977.)

пленках типа Cellоclear (Chemetron, Milano). Последние представляют собой прозрачные ацетилцеллюлозные мембраны (выпускаются в виде листов различного размера и толщины) с очень широкими порами, благодаря чему происходит быстрое установление равновесия при диффузии как низко-, так и высокомолекулярных субстратов. Получение отпечатка, а при необходимости окрашивание и удаление фона отнимает очень немного времени. Мембраны этого типа весьма прочны и просты в обращении (Righetti et al., 1978).

Когда нет возможности использовать метод гистохимического окрашивания, биологическую активность сфокусированных белков можно определять в элюатах из геля, разрезанного на тонкие сегменты с помощью одного из приемов, описанных в

разд. 3.3.4. Ясно, что в настоящей книге невозможно достаточно полно осветить все возможные варианты применения метода зимограмм. Перед нами стояла задача привести только некоторые характерные примеры, иллюстрирующие возможности этого широко распространенного метода. Более подробная информация по применению метода зимограмм в сочетании с электрофоретическими методами разделения содержится в обзорах Gabriel, 1971; Shaw, Prasad, 1970, и Siciliano, Shaw, 1976. В прекрасном практическом руководстве «Пособие по применению электрофореза ферментов для изучения генетики человека» (Harris, Hopkinson, 1976), а также в дополнениях к нему, изданных в 1977 и 1978 гг., много внимания уделено использованию метода зимограмм, приведены подробные прописи и методики. Благодаря значительно более высокой разрешающей способности ИЭФ с его помощью удается зарегистрировать значительно более высокий уровень полиморфизма сывороточных и тканевых белков, чем в случае обычного зонального или диск-электрофореза. ИЭФ становится одним из основных методов популяционной генетики и криминалистической серологии (см. например, Kühnl et al., 1977a,b,c; 1978; 1979; Kühnl, 1979, 1981). На рис. 3.25 приведен пример, позволяющий сравнить данные по частоте полиморфизма, полученные с помощью электрофореза и ИЭФ. Благодаря применению ИЭФ удалось обнаружить много новых аллельных форм белков, микрогетерогенность которых уже была установлена ранее, а также выявить наличие полиморфизма белков, которые, согласно прежним данным, считались представленными единичными формами.

3.4. Методы двумерного фракционирования

Было подсчитано (Giddings, 1969), что, несмотря на высокую разрешающую способность электрофоретических методов, число теоретических тарелок, эквивалентное одному электрофоретическому эксперименту (при разумных значениях длины пути, падения напряжения, с учетом реальных коэффициентов диффузии), составляет около 2000. Соответственно ни один из электрофоретических методов сам по себе не позволяет полностью разделить все компоненты сложных белковых смесей. В особенности это относится к фракционированию белков физиологических жидкостей, для которых молекулярная масса и содержание отдельных компонентов варьируют в пределах трех порядков при относительно небольших вариациях в суммарном заряде и свободной электрофоретической подвижности. Повышение загрузки образцом, как правило, не помогает обнаружить минорных компонентов, которые в этом случае проявляются в виде едва заметных «плечиков» или искажений на симметричных

гауссовых кривых распределения основных компонентов. Поэтому представляется весьма логичным сделать следующий шаг и ввести двумерное фракционирование, которое должно обеспечить максимальное расхождение белковых пятен и более или менее равномерное распределение их по рабочей поверхности двумерного геля. При этом можно получить белковую карту, на которой каждое индивидуальное пятно будет однозначно определяться двумя координатами, отражающими физико-химические характеристики индивидуальных белковых компонентов (например, пары значений pI—M_r целого белка, pI—M_r субъединицы или M_r целого белка—M_r субъединицы и т. п.). Если стремиться к тому, чтобы в результате двумерного фракционирования белковые пятна оказались достаточно равномерно распределенными по всей поверхности, а не выстраивались по диагонали геля второго направления, то желательно, чтобы в основе процессов разделения в первом и во втором направлениях лежали существенно разные принципы фракционирования. Такой подход довольно эффективно реализуется при получении пептидных карт с помощью электрофореза и хроматографии на бумаге (метод «отпечатков пальцев»), когда в первом направлении происходит разделение пептидов по заряду, а во втором — по коэффициенту распределения между подвижной (органической) и неподвижной (водной) фазами. Двумерное электрофоретическое фракционирование белков можно проводить таким образом, чтобы их разделение в первом направлении было основано только на различии в заряде (или «свободной» электрофоретической подвижности), а во втором — на различии в размере молекул (или наоборот). При такой постановке опыта можно ожидать, что белковые пятна будут равномерно распределены по всей поверхности геля.

В одной из первых работ по двумерному фракционированию белков (Smithies, Poulik, 1956) использовался электрофорез на бумаге с последующим электрофорезом в крахмальном геле в перпендикулярном направлении. Позднее предлагалось использовать сочетание двух акриламидных гелей с разной пористостью (Raymond, Nakamichi, 1964; Holmes, 1967; Kaltschmidt, Wittman, 1970a) и даже с разными значениями pH разделения (Kaltschmidt, Wittman, 1970b; Fahnestock et al., 1973; Held, Nomura, 1973). Сочетая электрофорез по заряду с электрофорезом в градиенте пористости геля (Margolis, Kenrick, 1967, 1968), удалось повысить разрешение и одновременно связать положение белков на карте с их физико-химическими параметрами. Однако поистине новый этап в развитии методов двумерного фракционирования наступил лишь с появлением ИЭФ — метода, чувствительного только к суммарному заряду белковой молекулы, который можно применять в сочетании с другими элект-

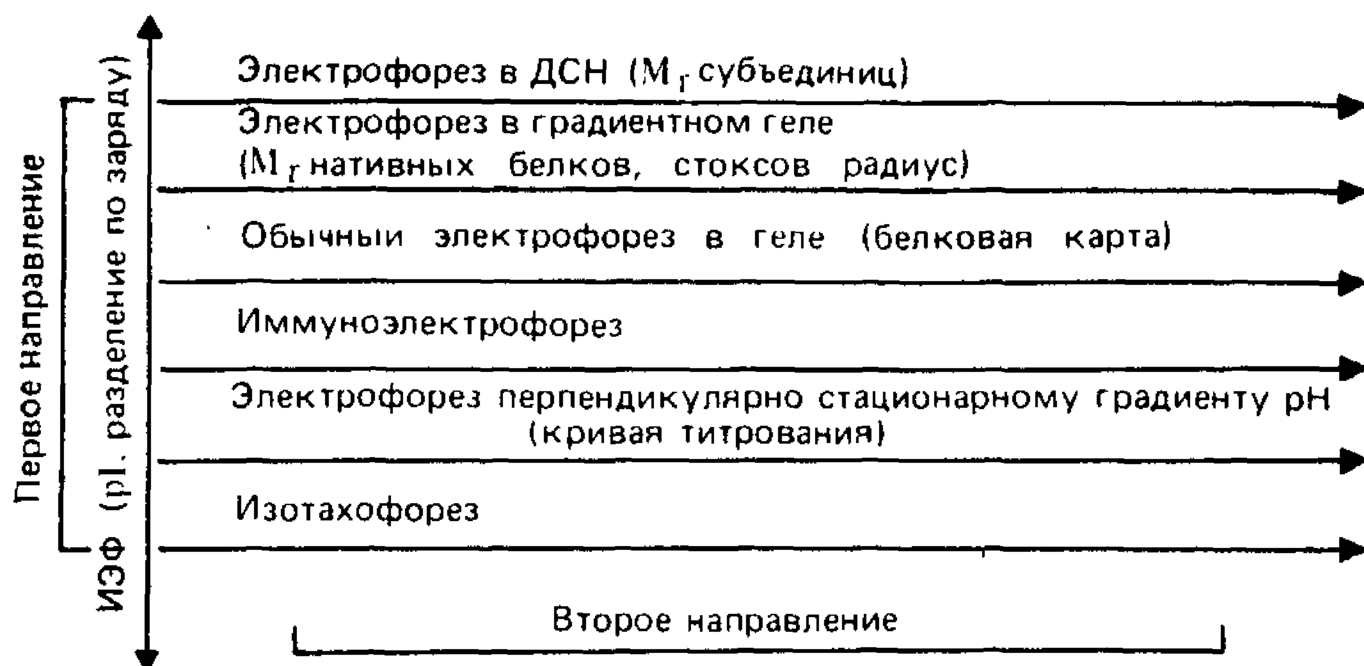


Рис. 3.26. Варианты метода двумерного фракционирования, в которых первой стадией разделения является ИЭФ. (Gianazza, Righetti, 1979.)

рофоретическими методами, основанными на разделении только по размеру, по размеру и заряду, а также по иммунологическим свойствам. Настоящее обсуждение будет ограничено только методами такого типа, которые отражены на рис. 3.26. На этом рисунке ИЭФ фигурирует как первая стадия фракционирования, хотя в отдельных случаях порядок стадий может быть и обратным. Впрочем, как правило, на первой стадии используется именно ИЭФ, которое позволяет анализировать очень разбавленные, непригодные для электрофореза образцы и обеспечивает получение очень узких зон, что существенно повышает качество разделения на второй стадии. Кроме того, применение электрофореза после ИЭФ приводит к удалению амфолитов, что облегчает последующий процесс окрашивания белков в геле.

3.4.1. ИЭФ — иммуноэлектрофорез (или иммунофиксация)

После ИЭФ можно проинкубировать гель непосредственно в буферном растворе, содержащем соответствующую антисыворотку (Carrell et al., 1969; Powell et al., 1975). Для определения фенотипических вариантов α_1-антитрипсина был использован метод «иммунной реплики», для чего на полиакриламидный гель после ИЭФ накладывали полоску ацетилцеллюлозы, содержащую соответствующие антитела (Arnaud et al., 1977). С той же целью в работе Johnson, 1978, использовались методы прямой и непрямой иммунофиксации. При ИЭФ в плоском геле для детектирования определенного белка можно наслоить небольшой объем (25—50 мкл/см^2) неразбавленной моноспецифической антисыворотки непосредственно на тот участок геля, где фокусируется данный белок. Это позволяет экономно расходовать антисыворотку, а также одновременно определять различ-

ные антигены, наслаивая разные антисыворотки в различных треках и на различные участки геля (Stibler, 1979).

Описаны и другие варианты метода иммуноэлектрофокусирования. Некоторые наиболее распространенные варианты продемонстрированы на рис. 3.27. Например, столбики или полоски геля после ИЭФ можно поместить в агарозный гель, содержащий антитела, и затем провести электрофорез сфокусированных белков в перпендикулярном направлении (перекрестное иммуноэлектрофокусирование). Комплексы антигенов с антителами образуют конусообразные зоны преципитации, по площади которых можно достаточно точно определить концентрацию антигена, аналогично методу ракет Лорелла (Laurell, 1966). Этот метод позволяет также исследовать иммунологические взаимоотношения двух близко расположенных антигенов (Alpert et al., 1972). Оказалось, однако, что при проведении иммуноэлектрофореза сфокусированных антигенов возникают серьезные проблемы вследствие контакта полиакриламидного и агарозного гелей. Различие в электроосмотических свойствах этих двух гелей приводит к тому, что в процессе электрофореза происходит накопление воды в полиакриламидном геле со стороны анода и высыхание агарозного геля возле границы с полиакриламидом со стороны катода. Эти процессы часто приводят к размыванию

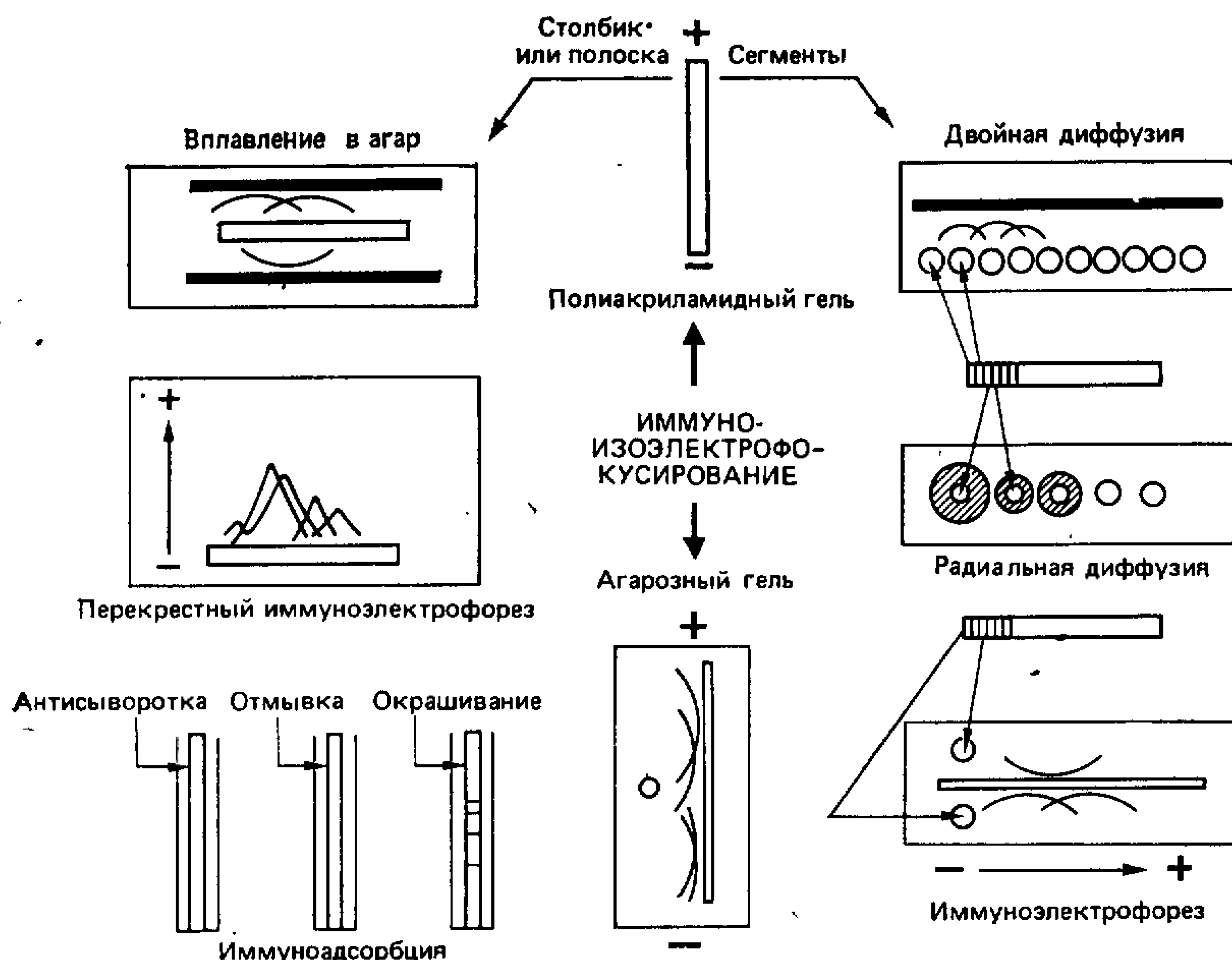


Рис. 3.27. Различные варианты сочетания ИЭФ с иммунологическим анализом в геле. (Catsimpoolas, 1973c.)

и искажению кривых иммунопреципитации. Практически полностью эту проблему удалось решить с помощью метода наложения полосок геля (Smyth et al., 1977). На рис. 3,28 *А—З* показана последовательность операций, используемых в этой методике. При работе необходимы скальпель со сменными ножами, длинное лезвие 20×150 мм, например типа Triumph Glass Cleaner, и еще одно такое же лезвие, зафиксированное на плексигласовой пластинке. После ИЭФ электродные полоски вместе с соответствующими участками геля отрезают и отбрасывают (рис. 3.28,*А*,*Б*). Затем гель накладывают на трафарет и с помощью фиксированного лезвия и скальпеля разрезают на полоски (рис. 3.28,*В*), соответствующие трекам фокусирования каждого из образцов. После этого с помощью гибкого лезвия каждую полоску можно легко отделить и переложить на поверх-

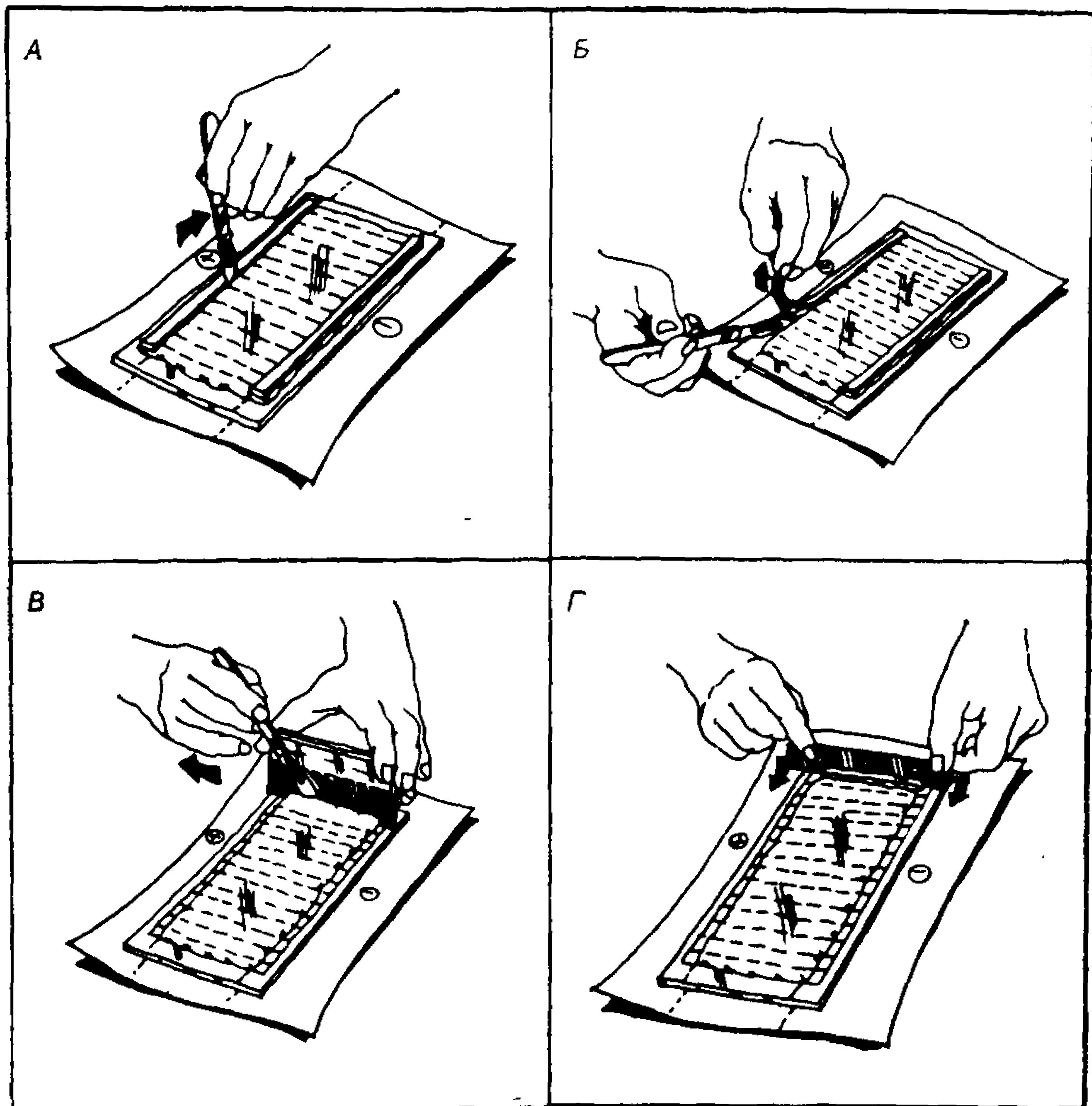
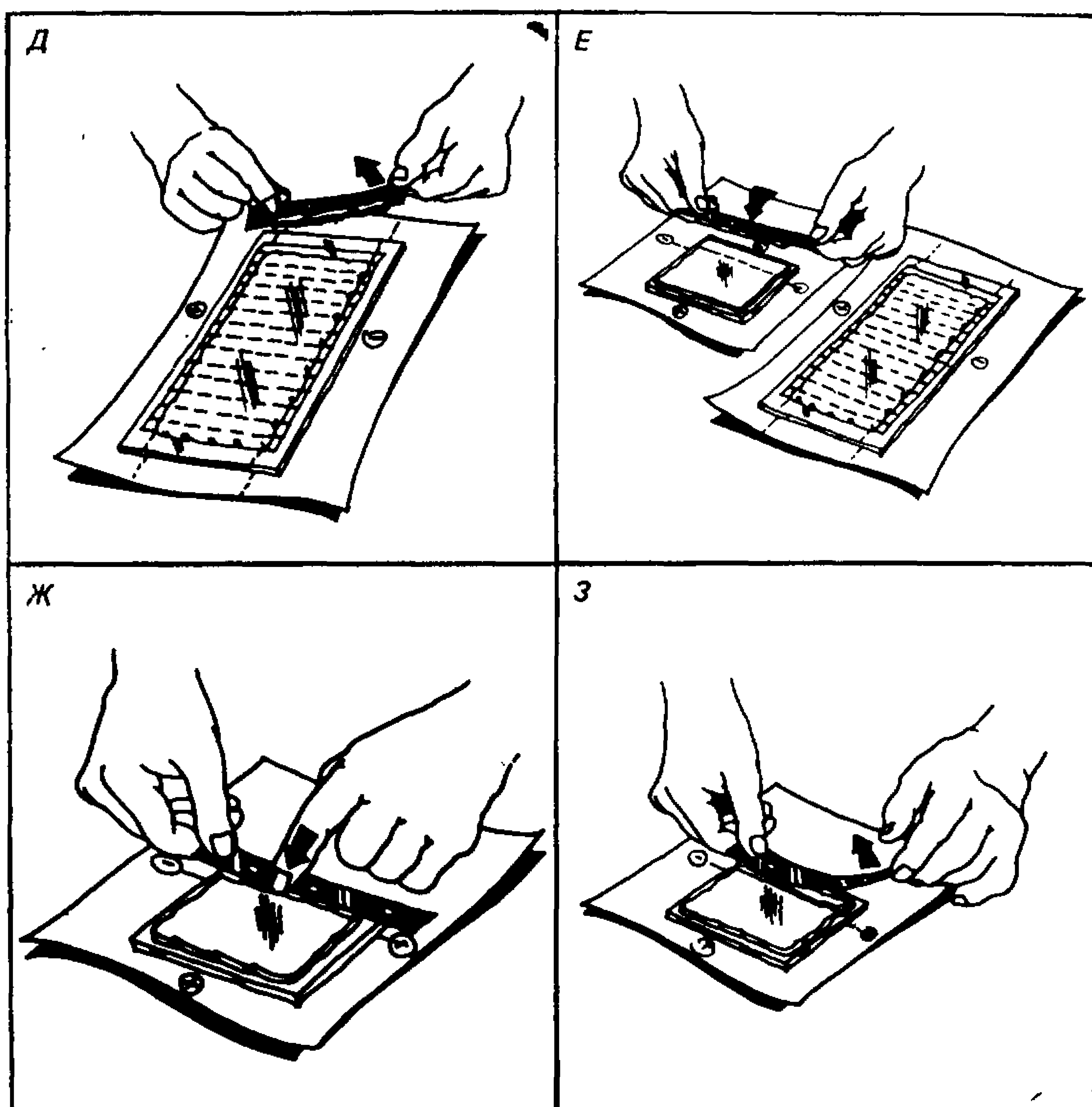


Рис. 3.28. Процедура наложения полоски геля при подготовке к проведению второй стадии перекрестного ИЭФ—иммуноэлектрофореза. От пластины ПААГ отрезают полоску, содержащую сфокусированные белки, переворачивают и накладывают на поверхность пластины агарозного геля второго направления (подробности см. в тексте). (Smyth et al., 1977.)



ность агарозного геля второго направления. Следует обратить внимание на то, чтобы полоска геля прилегала к агарозному гелю той поверхностью, на которую наносились фокусируемые образцы. Данный метод позволяет получать хорошо воспроизводимые неискаженные кривые иммунопреципитации (Sölderholm, Smyth, 1975). В настоящее время метод сильно упростился за счет применения полиэфирных подложек для заливки гелей (разд. 3.2.12), и теперь разрезание геля на полоски и перенесение полосок на агарозный гель не составляет практически никакого труда (разд. 3.4.6). Более того, с появлением агарозы типа IEF (разд. 3.2.4) проблема контакта между гелями первого и второго направлений снимается, поскольку оба этапа фракционирования можно проводить в одной и той же матрице.

Недавно был описан метод «множественных иммунных реплик» (Legocki, Verna, 1981), особенно эффективный в сочетании с двумерным фракционированием. Белки, разделенные в двумерном геле, подвергают электрофоретическому переносу на несколько листов нитроцеллюлозной пленки (с получением так называемых частичных «вестерн-блотов»). Таким образом по-

лучают несколько идентичных реплик (обычно 2—3, а для наиболее интенсивных белковых зон — 4 или 5 реплик). Каждую реплику можно последовательно обработать серией различных антисывороток (тремя и более), удаляя предшествующие антитела обработкой при pH 2,2. Комплексы антиген—антитело выявляются с помощью белка А, меченного ^{125}I. Этот метод позволяет обнаруживать белки с использованием не менее чем девяти различных антисывороток.

3.4.2. ИЭФ — электрофорез в геле

Этот подход сочетает разделение по заряду с разделением и по заряду, и по размеру во втором направлении. В работе Dale, Latner, 1969, было впервые показано, что такой метод фракционирования позволяет зарегистрировать количественные и качественные изменения при сравнении белковых карт нормальной и патологической сыворотки. После ИЭФ в цилиндрическом ПААГ столбик геля, содержащий сфокусированные белки, помещали на верхний торец пластины геля второго направления, в котором осуществлялось электрофоретическое разделение белков. Электрофоретическая подвижность белков и амфолитов при миграции в геле определяется соотношением заряда и молекулярной массы. Амфолиты, таким образом, легко отделяются от белков, в результате фракционирования которых образуется характерная белковая карта. Для сохранения электрофореграммы пластину геля можно высушить на подложке после окрашивания и вымачивания в 7%-ной желатине и 3%-ном глицерине. На полученных таким образом белковых картах удавалось идентифицировать многие известные компоненты сыворотки с применением стандартов, а также различных вариантов гистохимического и иммунологического детектирования (Dale, Latner, 1969). Разработанный метод был успешно использован в клинике, в частности при почечных синдромах, моно- и поликлональной гаммапатии, множественном склерозе, IgG-миеломатозе, протеинурии (Latner, 1973), а также для определения генетических вариантов гаптоглобина (Latner, Ames, 1975). Аналогичный подход был также применен для анализа белков из пшеничного зерна (Wrigley, 1968b; Wrigley, Shepherd, 1973). При обычном электрофорезе в препарате пшеничного глиадина удавалось обнаружить около 20 различных компонентов и примерно столько же компонентов при ИЭФ. При сочетании этих двух методов фракционирования число разделяемых компонентов возрастало примерно вдвое. Двумерное фракционирование такого же типа в работах Macko, Stegeman, 1969, и Stegeman et al., 1973, было использовано для «картирования» белков картофеля. Эти авторы также отметили, что при сочетании

двух методов удается получить картину разделения более подробную и более специфическую для каждой данной разновидности картофеля, чем в случае проведения одномерного электрофореза или ИЭФ.

3.4.3. ИЭФ — электрофорез в градиентном геле

Использование ИЭФ и электрофореза в геле продемонстрировало широкие возможности техники двумерного фракционирования для генетических и таксономических исследований. Однако при традиционном гелевом электрофорезе белки разделяются одновременно и по массе, и по заряду, а в отдельных случаях эти два фактора противоположным образом сказываются на подвижности, что соответственно снижает эффективность разделения (Rodbard et al., 1974). Для решения этой проблемы в работе Kenrick, Margolis, 1970, описанная выше методика была модифицирована таким образом, чтобы разделение сфокусированных белков во втором направлении происходило только на основании различий в размерах молекул. Авторы использовали пластины геля с вогнутым градиентом концентрации акриламида 4,5—26%. При электрофоретической миграции в таком геле белки достигают квазистационарного положения, которое определяется их молекулярным размером или стоксовым радиусом. Такой подход позволяет не только повысить разрешение, но и одновременно оценить значение M_r нативного белка. Вопрос состоит в том, можно ли в принципе с помощью электрофореза в градиенте пористости геля (в отсутствие ДДС-Na) точно определить M_r нативного белка. Эта проблема, вызывающая серьезные разногласия, специально исследовалась в работе Lambin, Fine, 1979. Авторы показали, что при градиентном электрофорезе существует линейная зависимость между расстоянием миграции белков и квадратом времени электрофореза. Построив соответствующие кривые для стандартных белков с известной молекулярной массой, по их наклону можно получить достаточно точные оценки M_r исследуемых нативных белков.

Один из вариантов этого метода был описан в работе Felgenhauer, Pak, 1975. В первом направлении проводилось ИЭФ в слое гранулированного геля (сефадекс G-75SF), а во втором — электрофорез в линейном градиенте (3—30%) ПААГ. Применение гранулированного геля на первой стадии ускоряет процесс достижения равновесия ИЭФ для таких крупных белков, как ферритин, α_2-макроглобулин и β-липопротеин, а также позволяет проводить быстрое детектирование сфокусированных зон с помощью метода бумажных реплик (Radola, 1973a, см. также разд. 2.2.3). Слой сефадекса при ИЭФ располагается на тонкой (0,15 мм) пластиковой пленке, благодаря этому по

окончании фокусирования полоску геля можно легко отрезать и перенести на пластину ПААГ второго направления. Электрофорез в градиентном геле в данном случае проводится в горизонтальной пластине, контакт которой с электродными резервуарами осуществляется с помощью бумажных фитилей. В процессе электрофореза, в том случае, если каждый компонент белковой смеси достигает положения, соответствующего его пределу эксклюзии (Felgenhauer, 1974), реализуется квазистационарное состояние. При этом удается достаточно точно оценить молекулярную массу разделяемых белков (Andersson et al., 1972; Rüchel et al., 1973).

3.4.4. Изоэлектрофокусирование — изотахофорез (ИЭФ—ИТФ)

Этот метод двумерного фракционирования был описан в варианте с обратной очередностью стадий: ИТФ—ИЭФ. С помощью перекрестного ИТФ—ИЭФ можно исследовать различия между принципами, лежащими в основе этих методов разделения. В предложенной методике ИТФ проводили в тонкой горизонтальной пластине ПААГ; вырезали полоску геля, накладывали ее на пластину геля второго направления (толщиной 0,5 мм) со стороны катода и проводили ИЭФ. Последовательное проведение ИТФ и ИЭФ сочетает в себе преимущества высокой разрешающей способности каждого из методов, а также позволяет преодолеть их некоторые специфические ограничения. Так, белки с очень близкими значениями pI удается разделить с помощью ИТФ при таком значении pH, при котором эти белки заметно различаются по электрофоретической подвижности. С другой стороны, белки со сходной зависимостью подвижности от pH в области pH, при котором проводится ИТФ, но различающиеся по pI при ИТФ будут мигрировать вместе, но разделятся при ИЭФ (Brogren, 1977).

3.4.5. ИЭФ в «поперечном» градиенте концентрации мочевины

Использование градиента концентрации мочевины в геле является весьма интересным приемом при анализе четвертичной структуры белков (Hobart, 1975). Полиакриламидный гель заливают между стеклянными пластинами таким образом, чтобы градиент концентрации мочевины оказался ориентированным под углом 90° к направлению электрического поля. Образец наносят по всей ширине геля с помощью длинной полоски фильтровальной бумаги параллельно электродам. Таким образом, фокусирование образца будет происходить на участках с различным (плавно нарастающим) содержанием мочевины. Инфор-

мация, которая может быть получена в экспериментах такого рода, проиллюстрирована в общем виде на рис. 3.29. В случае ковалентно связанных (т. е. не диссоциирующих в присутствии мочевины) структур белковая зона выглядит как прямая линия в тех случаях, когда денатурация не сопровождается изменением pI (рис. 3.29,а). Изменение pI при денатурации может про-

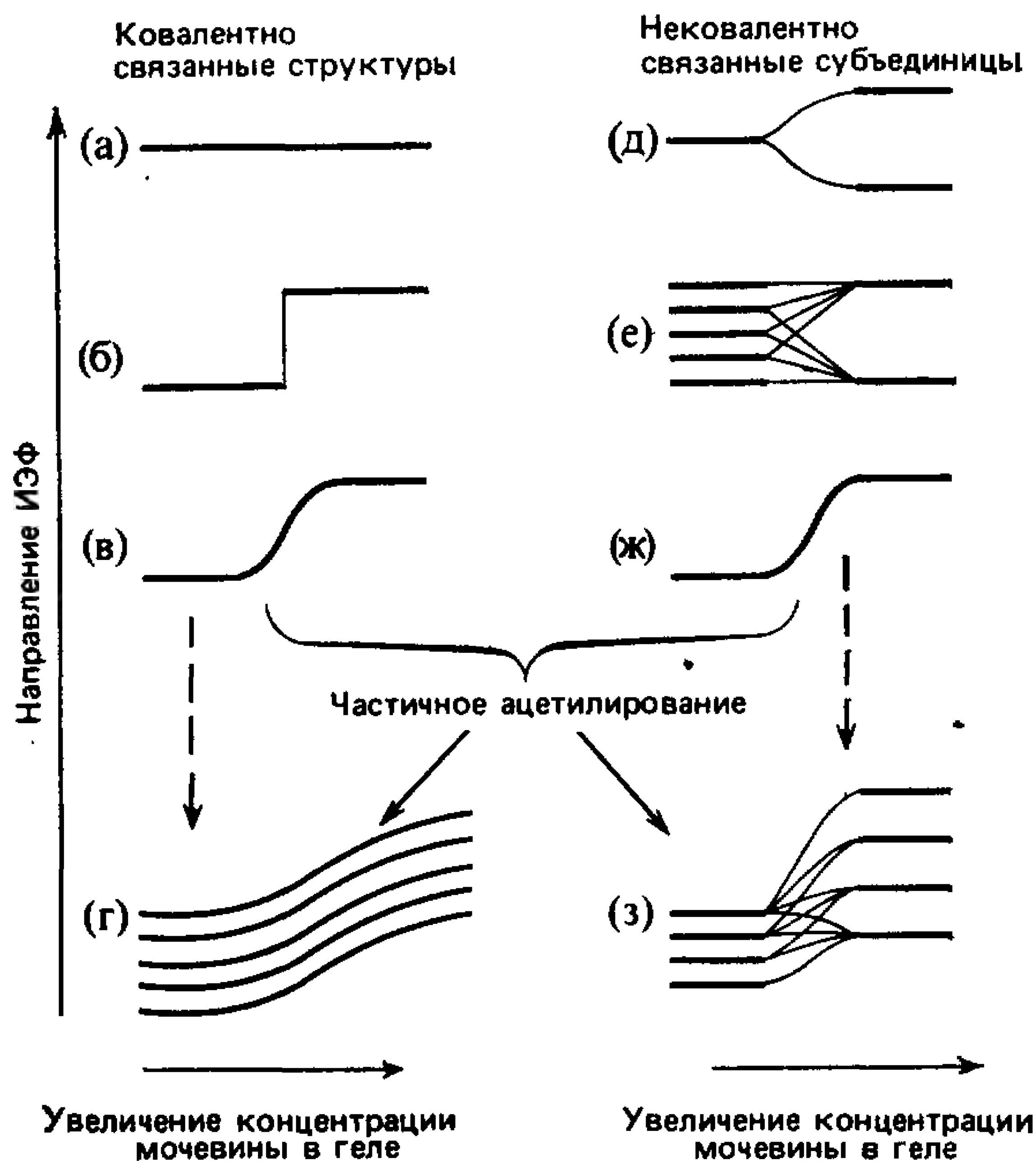


Рис. 3.29. Различные варианты распределения полипептидных зон при ИЭФ нативных или частично ацетилированных белков в плоских гелях в присутствии непрерывного градиента концентрации мочевины. (Hobart, 1975.)

текать скачкообразно, при некоторой критической концентрации мочевины (рис. 3,29,б), или плавно, в широком диапазоне концентраций (рис. 3.29,в). Химическая модификация, например частичное ацетилирование одноцепочечных (или ковалентно связанных) структур, будет проявляться в образовании набора зон, параллельных друг другу вдоль всего градиента мочевины (рис. 3.29,г). В случае белка, состоящего из субъединиц, соединенных нековалентными связями, одна полоса нативного белка при повышении концентрации мочевины расщепляется на несколько полос, соответствующих свободным субъединицам (рис. 3.29,д). При фокусировании изоферментов, представляющих собой статистический набор комбинаций нескольких типов субъединиц

(например, двух типов субъединиц лактатдегидрогеназы), переход в область повышенных концентраций мочевины сопровождается появлением диффузных сливающихся полос вместо характерного набора зон. Эти диффузные полосы при дальнейшем повышении концентрации мочевины трансформируются в дискретные зоны, соответствующие субъединицам (рис. 3.29,е). Если белок состоит из нескольких идентичных субъединиц, то его изоэлектрическая кривая денатурации окажется неотличимой от кривых, соответствующих денатурации ковалентных структур (рис. 3.29,ж). Различия между субъединицами можно выявить с помощью химической модификации (например, частичного ацетилирования), сопровождающейся изменениями заряда. В этом случае дискретные зоны искусственно полученных «изоферментов» при переходе в область денатурации будут трансформироваться с образованием сложной картины разделения, подобной той, которая показана на рис. 3.29,е.

К сожалению, работа Hobart, 1975, которая мне представляется одной из самых изысканных в области изучения белковых структур с помощью ИЭФ, осталась почти не замеченной в научном мире. В то же время большинство сделанных автором предположений нашли подтверждение в прекрасной работе Creighton 1979, посвященной исследованию денатурации белков при электрофоретическом фракционировании в поперечном градиенте концентрации мочевины.

3.4.6. ИЭФ — электрофорез в ДСС-Na

Этот метод является наиболее популярным, поскольку с его помощью лучше всего удается решить основную задачу картирования белков — получить максимально равномерное распределение пятен на поверхности геля второго направления. Впервые метод двумерного разделения по заряду, а затем по массе был предложен еще в работах Barrett, Gould, 1973а, и McGillivray, Rickwood, 1974. Однако в работе O'Farrell, 1975, был описан простой способ приготовления градиентного геля с ДДС-Na и сборки формы для осуществления второй стадии фракционирования. Используя в качестве метода детектирования радиоавтографию, автору удалось зарегистрировать более тысячи различных белковых пятен в геле второго направления. Только с появлением этой работы данный способ двумерного фракционирования начал приобретать широкую популярность. Первое время при двумерном разделении стадия ИЭФ всегда предшествовала стадии электрофореза в ДДС-Na (O'Farrell, 1975; Yeoman et al., 1974; Ames, Nikaido, 1976), поскольку считалось, что присутствие анионного детергента (ДДС-Na) при ИЭФ вызвало бы искажение градиента pH. Однако вскоре стало ясно, что белки,

обработанные ДДС-Na, можно подвергать ИЭФ без заметного искажения процесса фракционирования (Miller, Elgin, 1974; Danno, 1977). Недавно были описаны еще две методики, основанные на обратной последовательности стадий, — электрофорез в ДДС-Na—ИЭФ. Введение такой последовательности продиктовано вполне определенными экспериментальными потребностями. Так, кипячение в ДДС-Na является очень удобным способом получения клеточных экстрактов, поскольку оно вызывает практически полную солюбилизацию связанных с мембранами белков и одновременно снижает вероятность модификации клеточных белков киназами, протеиназами и другими эндогенными ферментами. В одном из таких методов полоску, вырезанную из геля после электрофореза в ДДС-Na, накладывают на гель для ИЭФ, содержащий 8,5 М мочевину и 2,5%-ный нонидет NP-40 (Tuszynski et al., 1979). Совместное действие мочевины и неионного детергента в геле приводит к расщеплению комплекса белок—ДДС-Na. Наилучшие результаты были получены при концентрации детергента в геле 2,5—3,5%; при содержании NP-40 ниже 2 или выше 4% наблюдалось ухудшение разделения. В другом варианте (Siemankowski et al., 1978) гель после электрофореза в ДДС-Na быстро обрабатывали суспензией 1%-ной ДЭАЭ-целлюлозы в (30 мМ трис—0,225 М глицин)-буфере, pH 8,6, содержащем 9 М мочевину, 5 мМ аскорбиновую кислоту, 0,2 мМ ЭДТА, 0,12%-ный меркаптоэтанол и 10%-ный глицерин. Каждый из компонентов суспензии играет определенную роль: мочевина способствует диссоциации комплекса белок-детергент и препятствует агрегации белков, ДЭАЭ-целлюлоза ускоряет удаление ДДС-Na из геля, аскорбиновая кислота и ЭДТА повышают растворимость белковых компонентов, меркаптоэтанол предотвращает образование дисульфидных мостиков, а глицерин уменьшает диффузию низкомолекулярных белковых компонентов.

Рассмотрим теперь более подробно некоторые практические аспекты проведения двумерного фракционирования. Остановимся на двух вариантах метода: (а) вертикальной системе (O'Farrell, 1975) и (б) горизонтальной системе с применением ультратонких гелей (Görg et al., 1980, 1981).

а. *Вертикальная система.* Конструкция формы для приготовления геля второго направления представлена на рис. 3.30. Пластина геля второго направления шириной 16,4 см, высотой 14,6 и толщиной 0,8 мм включает разделяющий гель с экспоненциальным градиентом полиакриламида (10—16% *T*) и концентрирующий гель (4% *T*). Пропись, по которой готовятся цилиндрический гель первого направления (ИЭФ) и пластина геля второго направления (электрофорез в ДДС-Na), приведена в табл. 3.12. Лизированные клетки, выращенные в присутствии ^{14}C-ами-

нокислот, после обработки ДНКазой и РНКазой экстрагируют раствором 9,5 М мочевины, содержащим 5% меркаптоэтанола, 2% NP-40, 1,6% амфолинов pH 5—7 и 0,4% амфолинов pH 3,5—10. При работе с радиоактивными образцами для одного опыта достаточно около 20 мкг суммарного белка, а при необходимости окрашивания СВВ в гель первого направления следует вносить около 100—250 мкг белка. После ИЭФ (см. табл. 3.12, *А*) гель вымачивают два раза по 60 мин в двух порциях (по 5 мл) исходного 62,5 м*М* трис—HCl-буфера, содержащего 2,3% ДДС-Na, 5% меркаптоэтанола и 10% глицерина. Контакт между цилиндрическим гелем первого направления и пластиной геля второго направления осуществляется при помощи концентрирующего геля (4%*T*) или 1%-ного агарозного геля. В работе Imada, 1978, предложено проводить электрофорез в геле, расположенном между непараллельными стеклянными пластинами, угол между которыми составляет 6,5°, что облегчает процесс соединения цилиндрического и плоского гелей первого и второго направлений соответственно. В тех случаях, когда требуется проводить электрофорез содержимого нескольких цилиндрических гелей в нескольких пластинах ДДС-Na—ПААГ, можно пользоваться системами, описанными в работе Anderson, Anderson, 1978a, b. Установка для нескольких параллельных двумерных разделений (ИЭФ—электрофорез в ДДС-Na) получила название «ИЗО-ДАЛЬТ», указывающее на то, что разделение основано на ИЗОэлектрофокусировании (т. е. на различии в заряде) в первом направлении и на различии в молекулярной

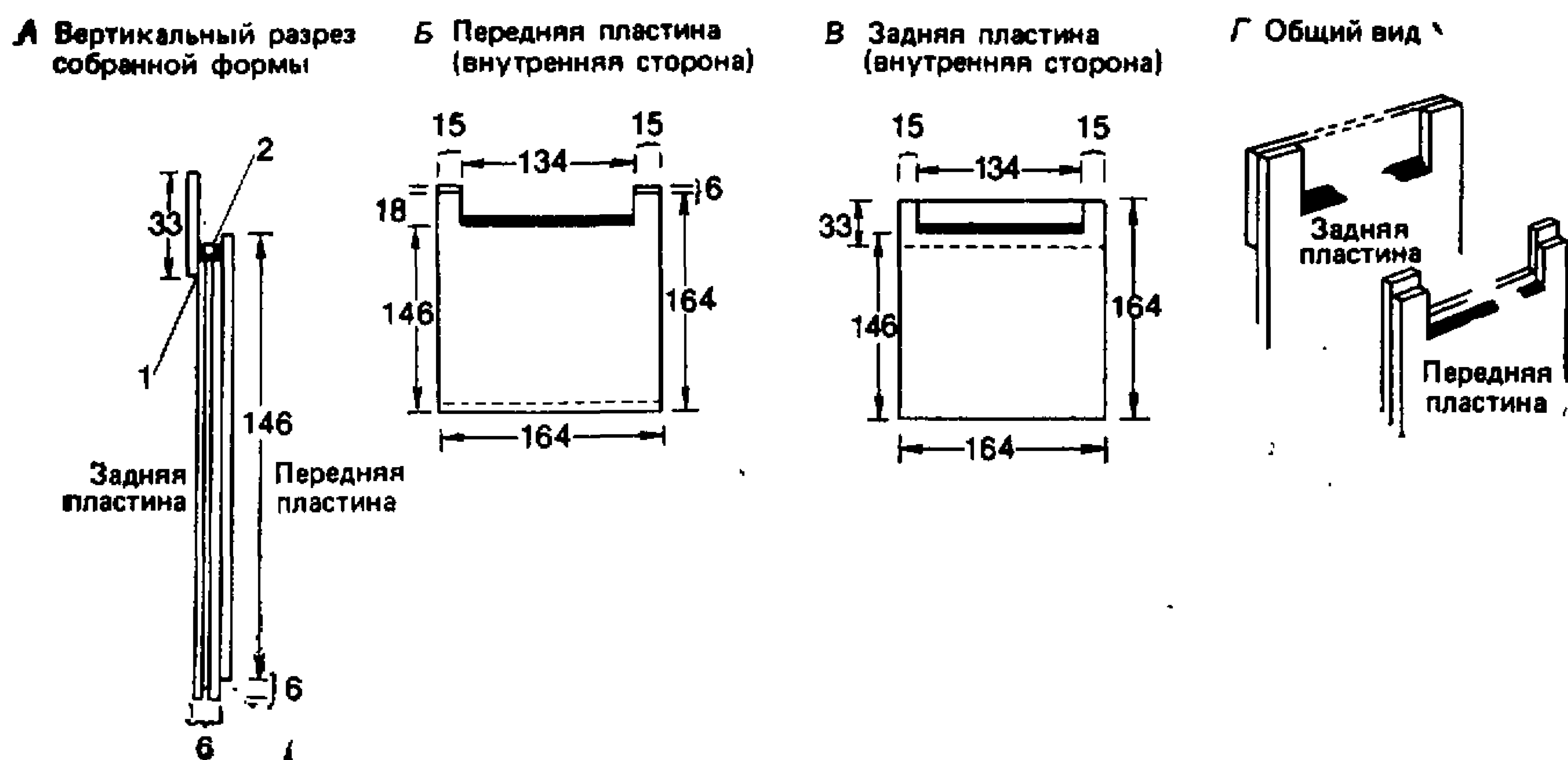


Рис. 3.30. Конструкция формы для приготовления пластины геля второго направления. После ИЭФ в первом направлении цилиндрический гель помещают в верхнюю часть пластины ПААГ для проведения ДДС-Na-электрофореза во втором направлении. Все размеры приведены в миллиметрах. 1 — эпоксидная смола, 2 — гель после ИЭФ. (O'Farrell, 1975.)

Таблица 3.12. ИЭФ — электрофорез в ДДС-Na (O'Farrell, 1975)

А. Приготовление геля первого направления (ИЭФ)

Для получения 10 мл геля смешивают:
5,5 г мочевины (сверхчистой)
1,33 мл раствора, содержащего 28,38% акриламида, 1,62% бис
2 мл 10%-ного нонидета NP-40
0,4 мл 40%-ных амфолинов (pH 5—7)
0,1 мл 40%-ных амфолинов (pH 3,5—10)
1,95 мл воды
10 мкл 10%-ного персульфата аммония
5 мкл ТЕМЭД

Б. Приготовление геля второго направления (электрофорез в ДДС-Na)

Разделяющий градиентный гель

Легкий раствор:

4 мл 0,4%-иого ДДС-Na в 1,5 М трис — HCl, pH 8,8
5,3 мл раствора, содержащего 29,2% акриламида, 0,8% биса
6,7 мл воды
8 мкл ТЕМЭД
25 мкл 10%-ного персульфата аммония

Тяжелый раствор:
2 мл 0,4%-ного ДДС-Na в 1,5 М трис — HCl, pH 8,8
4,3 мл раствора, содержащего 29,2% акриламида, 0,8% биса,
1,7 мл 75%-ного глицерина
4 мкл ТЕМЭД
10 мкл 10%-ного персульфата аммония

Концентрирующий гель

1,25 мл 0,4%-ного ДДС-Na в 0,5 М трис — HCl, pH 6,8
0,75 мл раствора, содержащего 29,2% акриламида, 0,8% биса
3,0 мл воды
5 мкл ТЕМЭД
15 мкл 10%-ного персульфата аммония

массе (выражаемой в ДАЛЬТонах) во втором направлении. На базе этой системы был также сконструирован прибор для электрофореза в восьми пластинах ПААГ одновременно (Dean, 1979), «комплементарный» традиционному восьмитрубочному электрофоретическому аппарату. В работе Rüchel, 1977, была описана методика двумерного микрофракционирования с использованием пластин геля размером с почтовую марку (линейный размер около 1 см). Системы микроэлектрофореза в градиенте пористости геля были использованы в работах Matsudaira, Burgess, 1978; Ogita, Market, 1979, и Poehling, Neuhoff, 1980 (см. также разд. 3.2.17).

Пример картины разделения, полученной при двумерном ИЭФ-электрофорезе в ДДС-Na, показан на рис. 3.31. Этим способом в лизате клеток *E. coli* было обнаружено более 1000 ин-

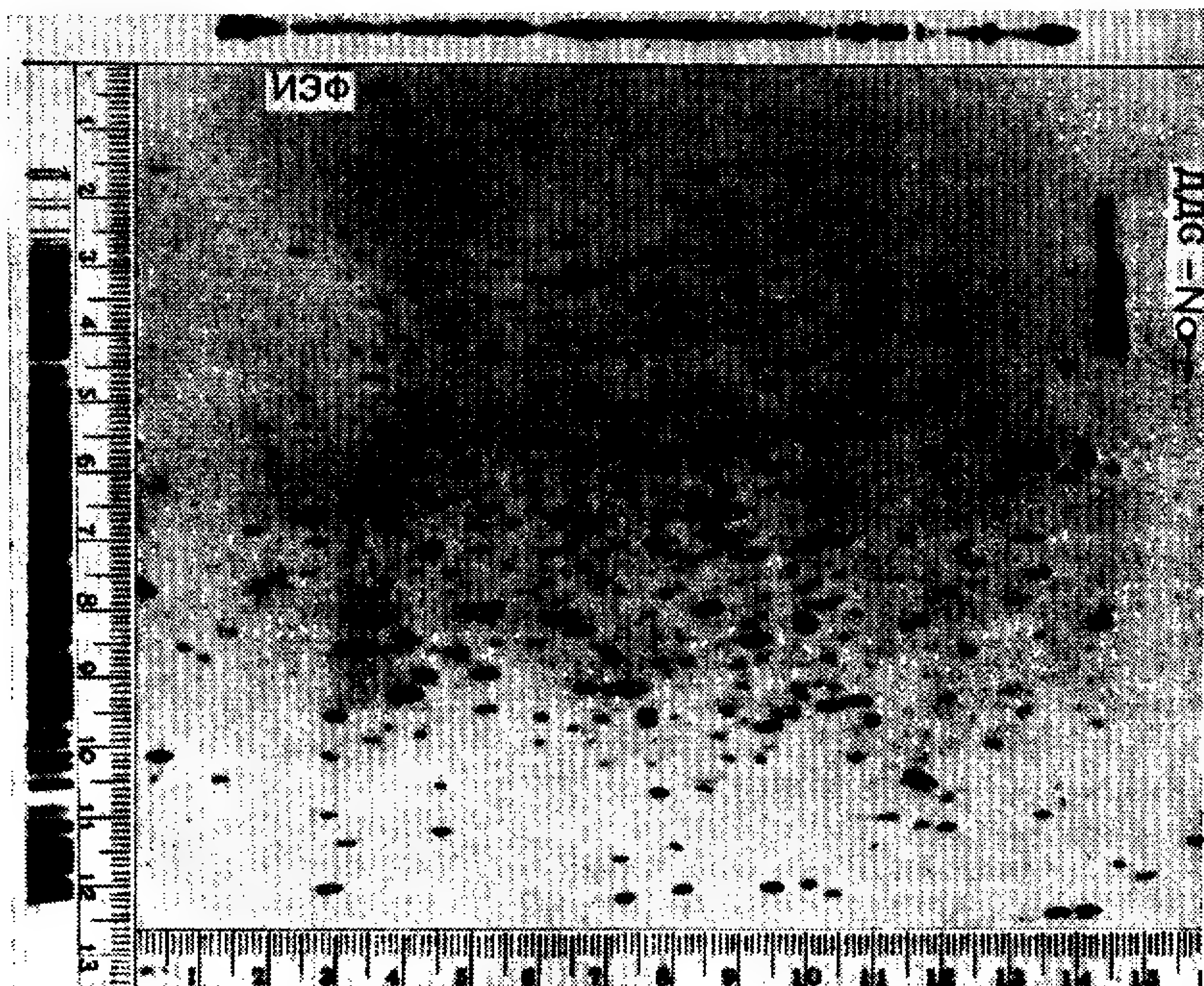


Рис. 3.31. Разделение белков *E. coli*, меченных ^{14}C-аминокислотами in vivo. После разрушения клеток ультразвуком и обработки ДНКазой и РНКазой белки растворяли в 9,5 М мочевине в присутствии ноидета NP-40 (2%), амфолинов pH 5—7 (2%) и меркаптоэтанола (5%). В гель первого направления (ИЭФ) вносили 25 мкл образца, содержащего около 10 мкг белка с радиоактивностью 180 000 имп./мин. Во втором направлении (ДДС-Na) проводили электрофорез в ПААГ (экспоненциальный градиент 9,25—14,4%). При экспонировании геля в течение 825 ч на радиоавтограмме удавалось обнаружить около 1000 белковых пятен. (O'Farrel, 1975.)

дивидуальных белковых компонентов. При этом удавалось зарегистрировать и оценить количественно белковые компоненты, содержание которых составляло всего лишь 10^{-6}—10^{-7} от количества суммарного клеточного белка. Пример использования двумерной карты для анализа белков плазмы человека приведен на рис. 3.32 (Anderson, Anderson, 1977).

б. *Горизонтальная система.* Двумерное фракционирование в горизонтальной системе описано в работах Görg et al., 1980, 1981. Во втором направлении разделение осуществляется в плоском тонком геле (толщиной около 360 мкм; правда, на сегодня представляется более удобным использовать гель толщиной 0,52 мм), фиксированном на специально обработанной полиэфирной пленке(см. также разд. 3.2.13). Готовят гель с вог-

нутым экспоненциальным градиентом (4—22,5) % *T* (рис. 3.33). На первом направлении также используется плоский гель толщиной 240 мкм, полимеризованный на пластиковой подложке. По окончании стадии ИЭФ белки фиксируют и окрашивают СВВ G-250. После подготовки геля второго направления от окрашенного первого геля ножницами отрезают нужную полоску (рис. 3.34), вымачивают ее в течение 2—4 мин в буфере с ДДС-Na и накладывают на пластину геля для электрофореза в ДДС-Na. На рис. 3.35 показано, как это делается, — полоску геля берут с двух концов пинцетами за выступающие края подложки и опускают (рабочей поверхностью вниз) в специальную ложбинку в геле второго направления. Преимущества этой системы заключаются в том, что за счет использования плоских гелей улучшается контакт между гелями 1-го и 2-го направлений, благодаря малой толщине первого геля достигается количественный переход белков во 2-й гель. Кроме того, процессы урав-

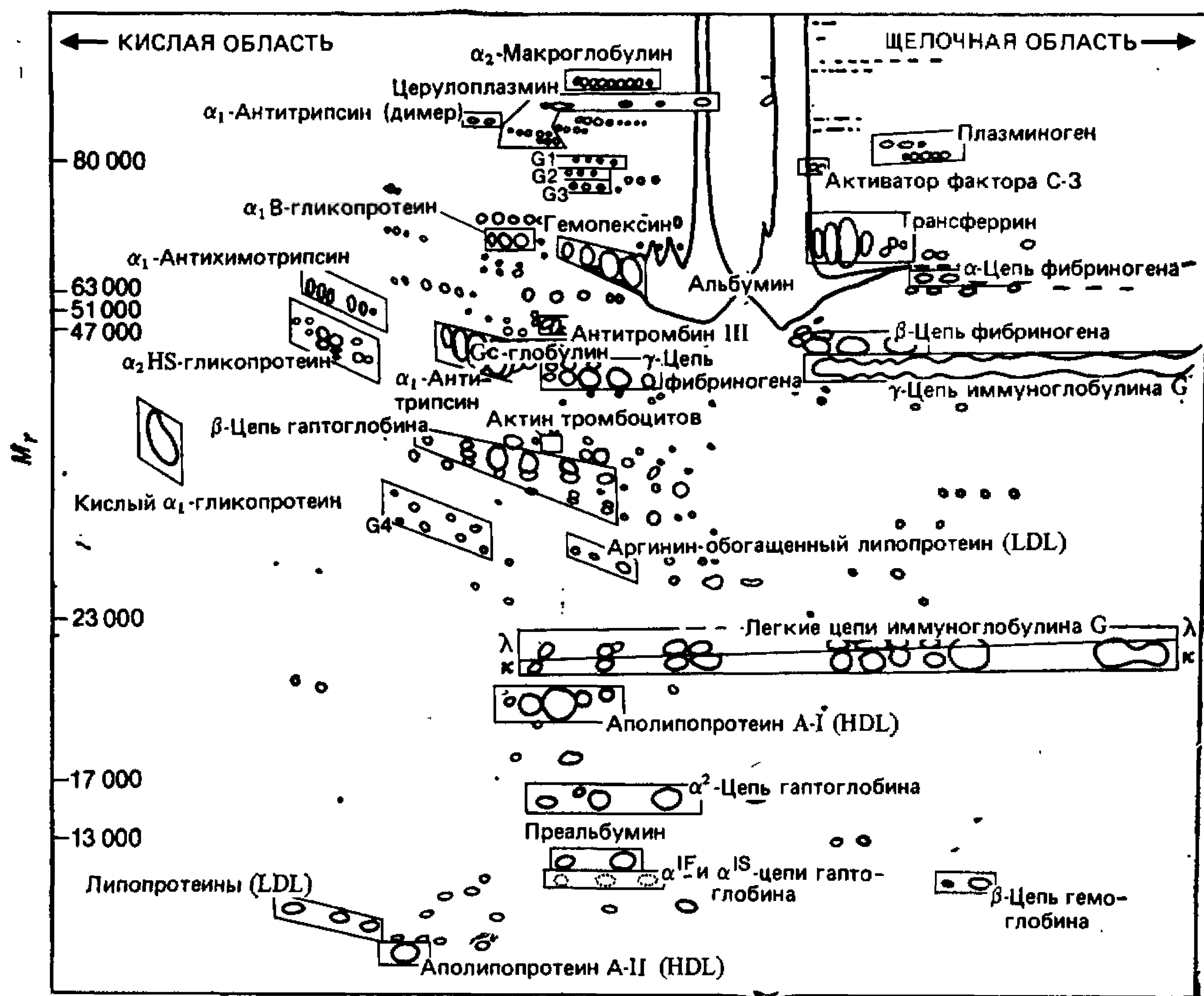


Рис. 3.32. Белковая карта, полученная при окрашивании геля после двумерного фракционирования белков плазмы крови человека. На карте помечены положения известных белков. Приведен скорректированный вариант опубликованной ранее карты, на которой были перепутаны положения α- и γ-цепей фибриногена. (Anderson, Anderson, 1977.)

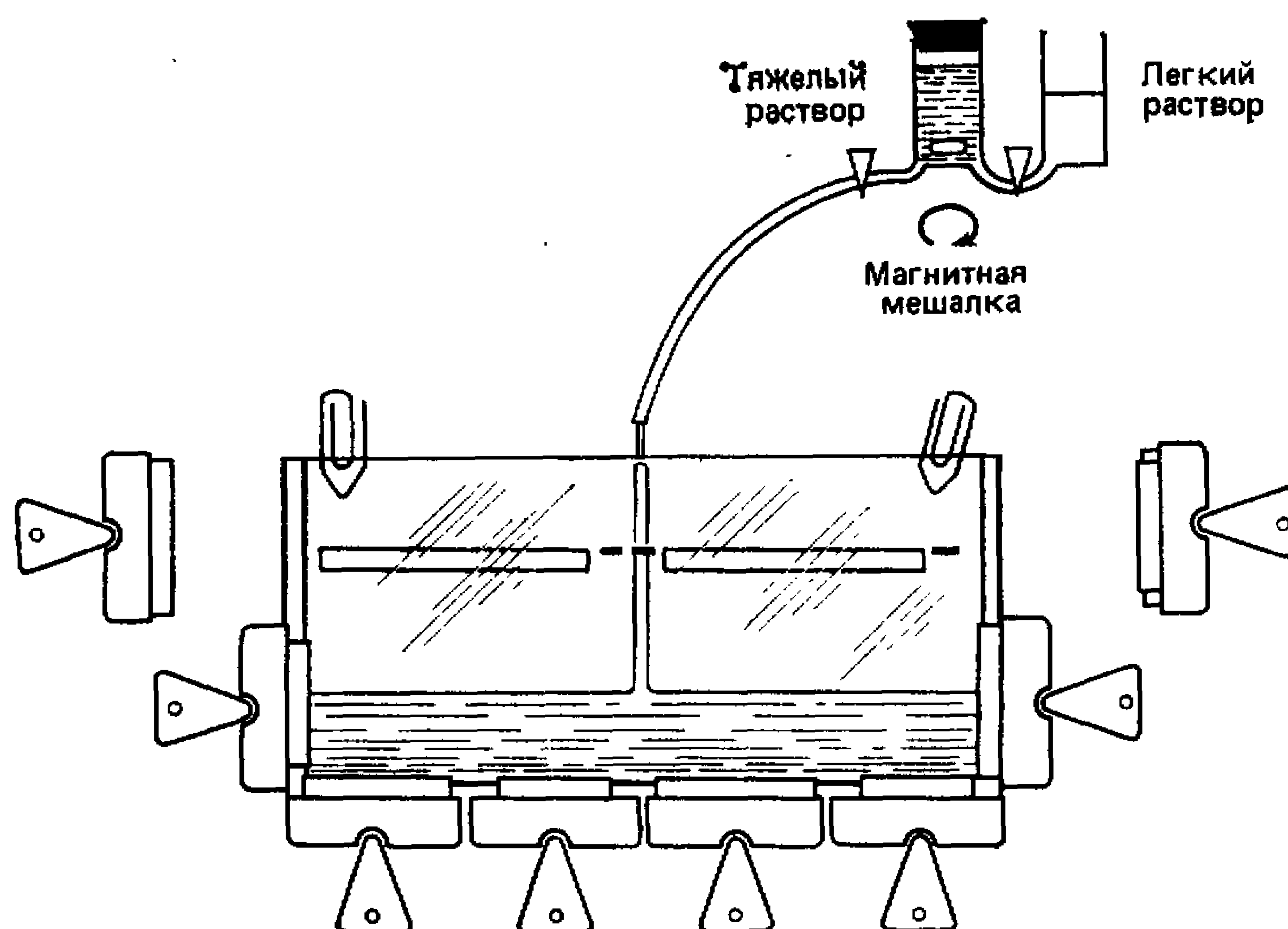


Рис. 3.33. Система для приготовления вогнутого экспоненциального градиента ПААГ (4—22,5) % *T*. Используются стекла от аппарата Multiphor (фирмы LKB); П-образиая прокладка вырезана из трех слоев парафильма (толщина геля 360 мкм). В резервуар с мешалкой заливают 5 мл рабочего раствора мономеров (*T*=22,5%, *C*=4%), содержащего 55% глицерина на основе 0,375 М трис-глицинового буфера (рН 8,8), во второй резервуар — 5 мл того же буфера без акриламида и глицерина. (Görg et al., 1981.)

новешивания, окрашивания, обесцвечивания фона и высушивания протекают значительно быстрее, чем в традиционных системах.

в. *Маркеры.* Когда смотришь на карту двумерного разделения, по которой разбросано более 2000 белковых пятен, невольно возникает аналогия со звездным небом в ясную ночь. Астрономам с давних пор было известно, что для ориентации в звездном небе совершенно необходимо иметь стандартные точки отсчета. Наиболее простым и эффективным способом получения стандартов для ИЭФ, по-видимому, является метод ступенчатого карбамилирования («carbamylation trains»), описанный в работах Anderson, Hickman, 1979, и Tollaksen et al., 1981. Известно, что при длительном нагревании белка в растворе мочевины происходит постепенное карбамилирование его аминогрупп под действием цианата, образующегося при разложении мочевины. Потеря белковой молекулой одной свободной аминогруппы при рН 8,5 вызывает изменение ее суммарного заряда на единицу. В геле второго направления продукты карбамилирования стандартного белка будут выглядеть как цепочки пятен с практически одинаковой молекулярной массой, расположен-

ных на расстоянии около 0,1 ед. pH друг от друга. При карбамилировании β-цепи гемоглобина человека образуется 12 таких пятен, соответствующих ступенчатому карбамилированию одиннадцати остатков лизина и одной концевой α-аминогруппы. Цепочка продуктов карбамилирования карбоангидразы из эритроцитов быка насчитывает 20 звеньев, а креатинфосфокиназы из мышцы кролика — 30.

В качестве стандартов для электрофореза в ДДС-Na можно использовать набор ковалентносшитых олигомеров какого-либо белка с известным значением M_r (Inouye, 1971). Однако такие олигомеры часто обнаруживают аномальное поведение при электрофорезе в ДДС-Na. Поэтому в качестве внутреннего стандарта на ДАЛЬТ-направлении было предложено использовать суммарный белок из гомогената сердца крысы (Giometti et al., 1980). При электрофорезе в ДДС-Na белки гомогената проявляются в виде 80 зон. При этом 12 основных зон располагаются по всей длине геля таким образом, что различия между значениями M_r соседних компонентов составляют от 300 (около трех аминокислот) до 10 000 (около ста аминокислот — преимущественно в верхней высокомолекулярной области геля). Этот гомогенат, экстрагированный раствором ДДС-Na и содержащий 0,7% агарозы, можно разлить по пробиркам небольшими аликвотами и хранить при температуре от —20 до —70 °С. При хранении в течение 12 мес такой препарат дает полностью воспро-

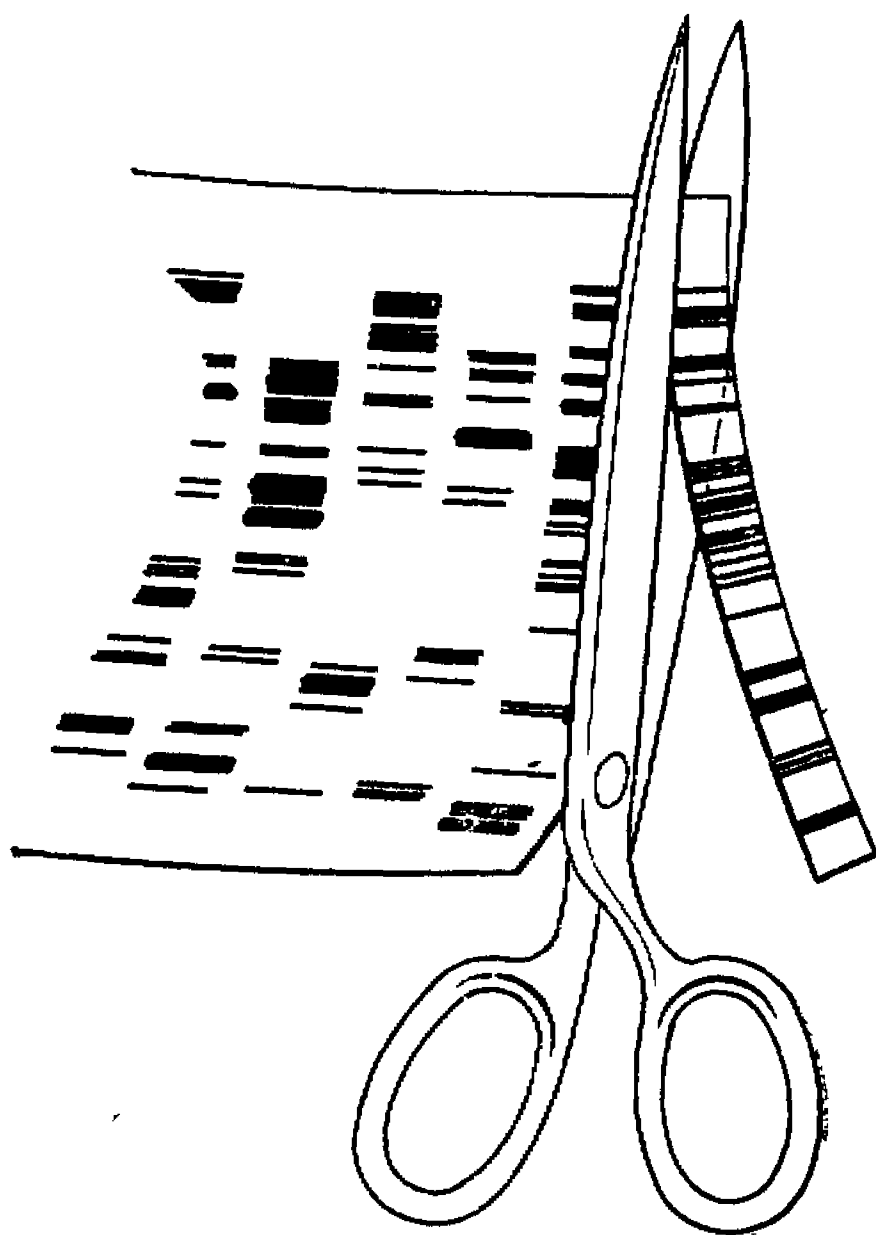


Рис. 3.34. Вырезание полоски после ИЭФ в ультратонком геле. Ширина полоски должна соответствовать ширине лунки в геле второго направления. (Görg et al., 1981.)

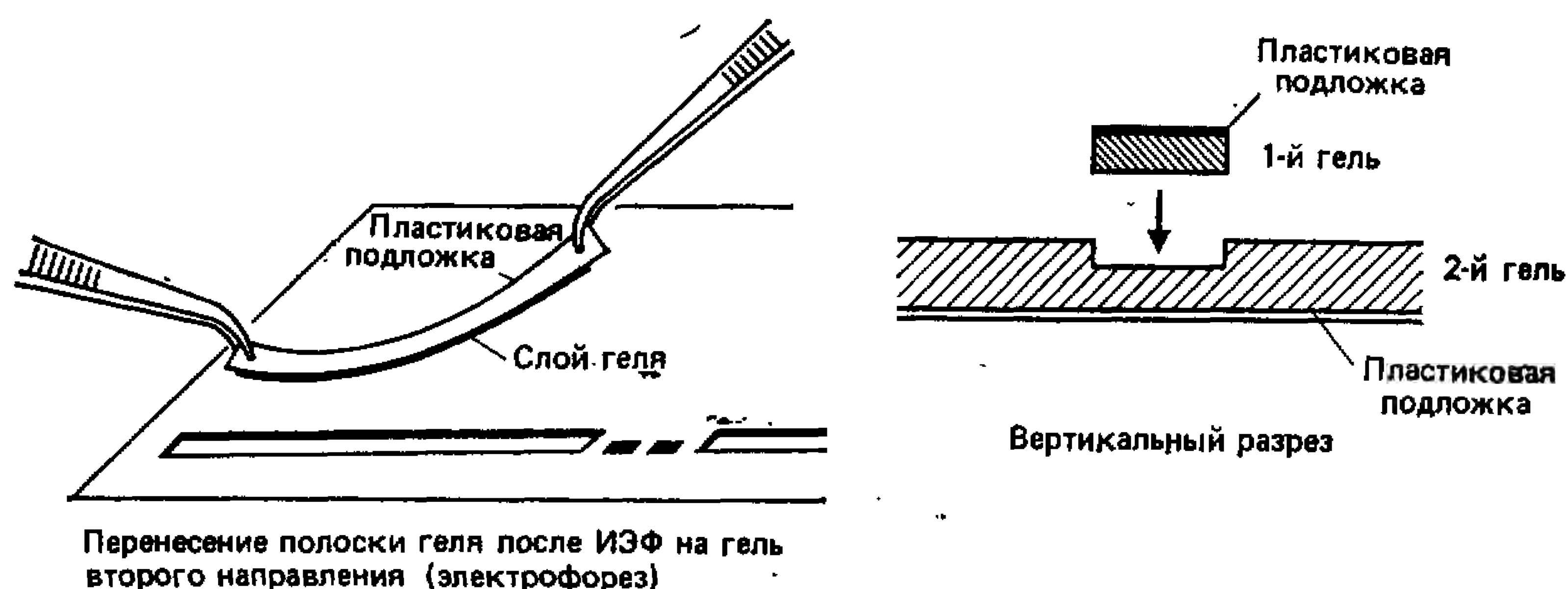


Рис. 3.35. Осуществление контакта между гелями 1-го и 2-го направлений. Полоску геля после ИЭФ споласкивают в воде, уравновешивают в буфере, содержащем ДДС-Na, удаляют избыток жидкости с поверхности и переносят в лунку, вырезанную в геле 2-го направления. Благодаря тому что гель зафиксирован на полиэфирной пленке (которая при наложении полоски должна оказаться сверху), операция перенесения полоски заметно облегчается. Справа показан вертикальный разрез участка контакта гелей. Видно, что лунка вырезается не на всю толщину геля 2-го направления. (Görg et al., 1981.)

изводимую картину разделения. Кроме того, в качестве окрашенного маркера для двумерных гелей предлагался цитохром *c* (Leader, 1980), а в качестве полного набора (pI—M_r)-стандартов — белки головки бактериофага T4 (Kurian et al., 1981).

г. *Денситометрирование.* Отчасти эта тема была рассмотрена в разд. 3.3.3. Кроме процитированных там работ, следует специально отметить ряд разработанных в последнее время программ для машинного анализа двумерных электрофореграмм, в особенности полученных с помощью окрашивания серебром. В самом деле, подобно тому как при двумерном электрофорезе вместо одной переменной приходится иметь дело с ортогональной системой координат, отражающей заряд и молекулярную массу белковых компонентов, так в методе окрашивания серебром по Sammons et al., 1981, появляется третья независимая переменная — цвет пятна. Помимо расположения на карте и интенсивности каждое индивидуальное белковое пятно при окрашивании серебром характеризуется индивидуальными цветовыми оттенками, обычно различного рода комбинациями желтого, красного, зеленого и синего цветов. Для количественного выражения этой «третьей координаты» в работе Vincent et al., 1981, была предложена программа для компьютера, позволяющая обрабатывать данные цифрового спектрометрирования двумерных электрофореграмм на нескольких длинах волн. Для этих целей авторы воспользовались универсальной программой обработки типа LANDSAT, предназначенной для анализа сложных спектральных сигналов, излучаемых удаленными спутниками Земли. Таким образом, утверждая, что современный биохимик должен пройти курс специальной подготовки по астрономии (см. разд.

3.3.3), я был прав только наполовину. На самом деле он должен выучиться еще и на астронавигатора.

Другая система компьютерного анализа двумерных белковых карт, получившая название GELLAB, описана в работе Lemkin, Lipkin, 1981. Программы сопоставления и коррекции таких карт были предложены также в работах Taylor et al., 1981, и Kronberg et al., 1981. Остается надеяться, что теперь кто-нибудь решится из всего этого разнообразия программ машинной обработки данных выбрать одну, наиболее доступную и в то же время наиболее эффективную, т. е. такую программу, которая могла бы с успехом использоваться во всех лабораториях мира.

д. *Применение.* Учитывая невероятное разнообразие методов двумерного фракционирования, вряд ли стоит пытаться целиком охватить столь необъятную тему. Поэтому я кратко отмечу только последние достижения в сфере их применения. Детальная информация по применению двумерных методов фракционирования содержится, например, в материалах последних симпозиумов (Righetti, 1975; Radola, Graesslin, 1977; Catsimpoolas, 1978; Radola, 1980; Allen, Arnaud, 1981). Начато систематическое картирование всех продуктов генома человека (Anderson, Anderson, 1977, 1978a,b), которых, по современным оценкам, насчитывается от 30 до 50 тысяч. Эти исследования включают картирование белков из эритроцитов (Edwards et al., 1980), слюны (Giometti, Anderson, 1980), мочи (Tollaksen, Anderson, 1980), лимфоцитов периферической крови (Willard, Anderson, 1980; Anderson, 1981). В литературе описано применение двумерного фракционирования в клинической биохимии (Thorsrud et al., 1980), а также для анализа липопротеинов человека (Zarnnis, Breslow, 1980), клеток, пораженных вирусом (Drzenieck et al., 1980), фибробластов человека (Singh et al., 1978; Burghess et al., 1981), белков цитозоля клеток печени (Elliott et al., 1978), ядерных белков (Hurley et al., 1978), оснóвных внутриклеточных белков (Sanders et al., 1980; Willard et al., 1979), белков из мембран эритроцитов (Harell, Morrison, 1979), митохондриальных рибосомных (Czempiel, 1979) и микросомных белков (Knüfermann, 1977), мембранных белков из корня волоса (Singh et al., 1981), белков слюны при кистозном фиброзе (Bustos, Fung, 1981) и белков амниотической жидкости человека (Burdett et al., 1981). К сожалению, к тому времени, когда этот список дойдет до читателя, он уже в значительной степени устареет.

3.5. Предстационарное ИЭФ (TRANSIEF)

В работах Catsimpoolas, 1973c—f, был предложен ряд остроумных экспериментальных приемов, позволяющих проводить контроль аналитического ИЭФ в режиме непрерывного сканирования. Это позволяет непосредственно наблюдать за ходом

фракционирования, в том числе и на самых первых его этапах. Метод дает количественную информацию о параметрах, характеризующих процесс ИЭФ, и помогает изучить некоторые физико-химические свойства амфотерных молекул. Система контроля объединяет сканирующее устройство с блоками непосредственной цифровой регистрации и обработки данных. Она позволяет непрерывно контролировать и регистрировать положение пиков и их площадь, следить за изменением градиента pH, определять значения pI. В отличие от традиционного ИЭФ, дающего информацию только о стационарном состоянии системы, метод предстационарного ИЭФ (TRANSIEF) позволяет следить за кинетикой разделения. Рассматриваются главным образом три разных этапа: начальное фокусирование, дефокусирование и рефокусирование. Первый этап включает процессы электрофоретической миграции амфотерных молекул в область своих значений pI с постепенным формированием стационарного состояния ИЭФ. На втором этапе рассматриваются процессы диффузии сфокусированных компонентов при снятии электрического поля, а на третьем — процессы «реставрации» стационарного состояния после повторного приложения поля.

Метод предстационарного ИЭФ позволяет получить важную информацию о минимальном времени, необходимом для фокусирования индивидуальной белковой зоны. Он также дает возможность количественно охарактеризовать процессы искажения или дестабилизации градиента pH, проявляющиеся, например, в виде так называемого «эффекта плато» или «катодного дрейфа» (см. разд. 4.9). В полном соответствии с прежними данными (Righetti, Drysdale, 1971) в работе Catsimpoolas, 1973c, было установлено, что эффект плато, как правило, проявляется в постепенном усилении миграции наиболее основных амфолитов к катоду при практически неизменном положении зон, примыкающих к аноду. Исследуя процесс дефокусирования, автор оценил коэффициенты диффузии различных белков. Для этого он измерял скорость уширения зоны в отсутствие электрического поля и определял зависимость дисперсии σ для диффундирующей зоны от времени и от концентрации геля. Из наклона соответствующих прямых были оценены коэффициенты диффузии D для различных белков. Впрочем, полученные таким образом значения D оказались значительно выше соответствующих значений, определяемых по данным ультрацентрифугирования. Возможно, это обусловлено взаимодействием белков с матрицей геля. С помощью настоящего метода можно также получить сведения о размере белковых молекул и их массе. Для этого определяют коэффициенты торможения белков при различных значениях пористости геля.

В работе Catsimpoolas, Griffith, 1973, была опубликована

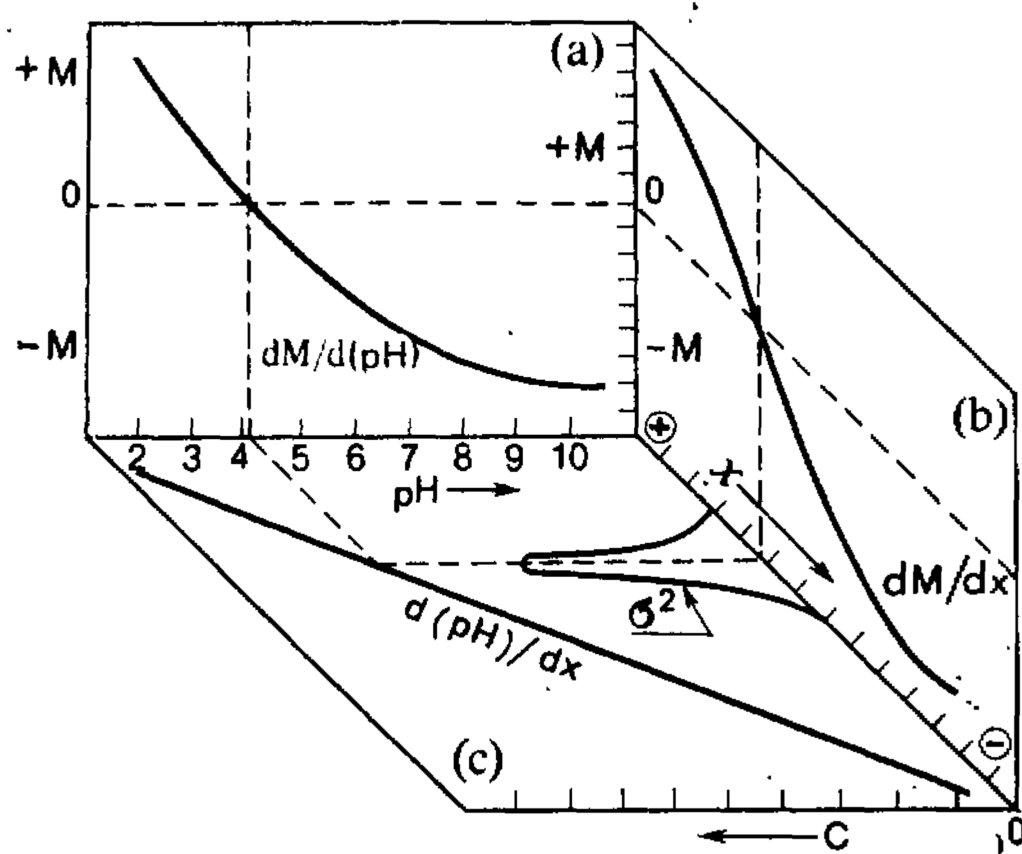


Рис. 3.36. Диаграмма, отражающая зависимость между pH, подвижностью, расстоянием миграции и концентрацией белка при ИЭФ. Характер движения белка по направлению к своей изоточке определяется зависимостью подвижности от pH (dM/dpH — плоскость a) и формой градиента pH (dpH/dx — плоскость c). Таким образом, наблюдаемая зависимость подвижности белка от координаты (dM/dx — плоскость b) определяется одновременно обоими упомянутыми выше параметрами. *Обозначения*: x — расстояние миграции (координата), M — подвижность, C — концентрация белка, E — напряженность поля, σ^2 — квадратичное отклонение, равное $D/(dM/dx)E$; $(dM/dx) = (dM/dpH)(dpH/dx)$; D — коэффициент диффузии; dM/dx — скорость миграции. (Catsimpoolas, 1975.)

программа для компьютерной обработки данных в методе предстационарного ИЭФ. На рис. 3.36 указаны различные физико-химические параметры, измеряемые с помощью этого метода (Catsimpoolas, 1975b). К сожалению, как сетует сам автор, «...хотя кинетическая теория и современное оборудование позволяют провести все интересующие нас измерения, необходимость введения многочисленных поправок, связанных с отклонениями от идеальности, которые возникают главным образом из-за несовершенства современных амфолитов, делает метод малопригодным. Освоить новые сферы применения ИЭФ поможет динамичное развитие новой методологии и аппаратуры, а также совершенствование соответствующих разделов кинетической теории и разработка столь необходимых методов синтеза амфолитов второго поколения». Решающим шагом на пути к «заветной цели» окажется использование иммобилизованных градиентов pH (см. разд. 1.11.7).

3.6. Обнаружение мутаций, приводящих к замене одной нейтральной аминокислоты на другую

Подавляющее большинство мутаций, обнаруживаемых по изменению положения белкового пятна на электрофореграмме,

связано с заменой какой-либо аминокислоты, несущей заряженную боковую группу. Например, для гемоглобинов человека на октябрь 1973 г. описаны 174 точечные мутации (Hunt, Dayhoff, 1974): 61 — в α-цепи, 99 — в β-цепи, 8 — в γ-цепи и 6 — в δ-цепи. Из всех них только 35 (т. е. около 20%) представляют собой замены нейтральной аминокислоты на нейтральную (главным образом замена Pro⇄Leu, составляющая около 30% всех мутаций такого типа), которые скорее всего были обнаружены не электрофоретическими методами, а по функциональным изменениям и локализованы с помощью химического анализа (обработка трипсином, получение пептидной карты и аминокислотный анализ аномальных пептидов). Обобщив эти данные и учтя среднестатистическую представленность заряженных аминокислот в белке, можно подсчитать, что только около 40% всех возможных мутаций сопровождается изменением заряда и соответственно может быть обнаружено электрофоретическими методами. Это значит, что остальные 60% мутаций будут в этом смысле «молчащими», т. е. их не удастся непосредственно выявить электрофоретическими методами. Есть некоторые основания считать, что с помощью ИЭФ можно обнаружить и эти, «молчащие», мутации. Хорошим примером тому являются результаты, полученные в опубликованной недавно статье Whitney III et al., 1979. При изучении гемоглобинов мыши с помощью ИЭФ авторам удалось зарегистрировать несколько нейтральных замен α-цепи. Были разрешены следующие гаплотипические варианты, несущие мутации в трех положениях, — α^{25}, α^{62} и α^{68}:$Hb_1(Gly^{25}$, Val^{62}, $Asn^{68})$; $Hb_2(Gly^{25}$, Val^{62}, $Ser^{68})$; $Hb_3(Gly^{25}$, Val^{62}, $Thr^{68})$ и $Hb_4(Val^{25}$, Ile^{62}, $Ser^{68})$. Значения изоэлектрических точек при фокусировании нативных тетрамеров от Hb_1 к Hb_4 последовательно убывают, а общая гидрофобность нарастает (рис. 3.37). По моим оценкам, гидрофобность Hb_2 по сравнению с Hb_1 по шкале гидрофобности из работы Nozaki, Tanford, 1971, изменяется на $\Delta f_t = -500$, а для пары Hb_3—Hb_2 $\Delta f_t = -800$ (в случае Hb_4 подсчет общей гидрофобности осложнен из-за отсутствия необходимого количества данных). Мне представляется, что повышение общей гидрофобности α-цепи вызывает соответствующее понижение pI тетрамера из-за уменьшения суммарного положительного заряда. Можно думать, что это не просто единичный случай, а проявление некоторой более общей закономерности. Так, в случае пероксидазы из хрена при связывании простетической группы — протогема IX — с имидазольной группой остатка гистидина в белке (Mauk, Girotti, 1974) рK этой группы уменьшается от своего обычного значения (около 6) практически до нуля (Dunford, Stillman, 1976). Найдено, что при инкубации протопорфирина IX (содержащего четыре имидазольные группы, две из которых протонируются со значением рK

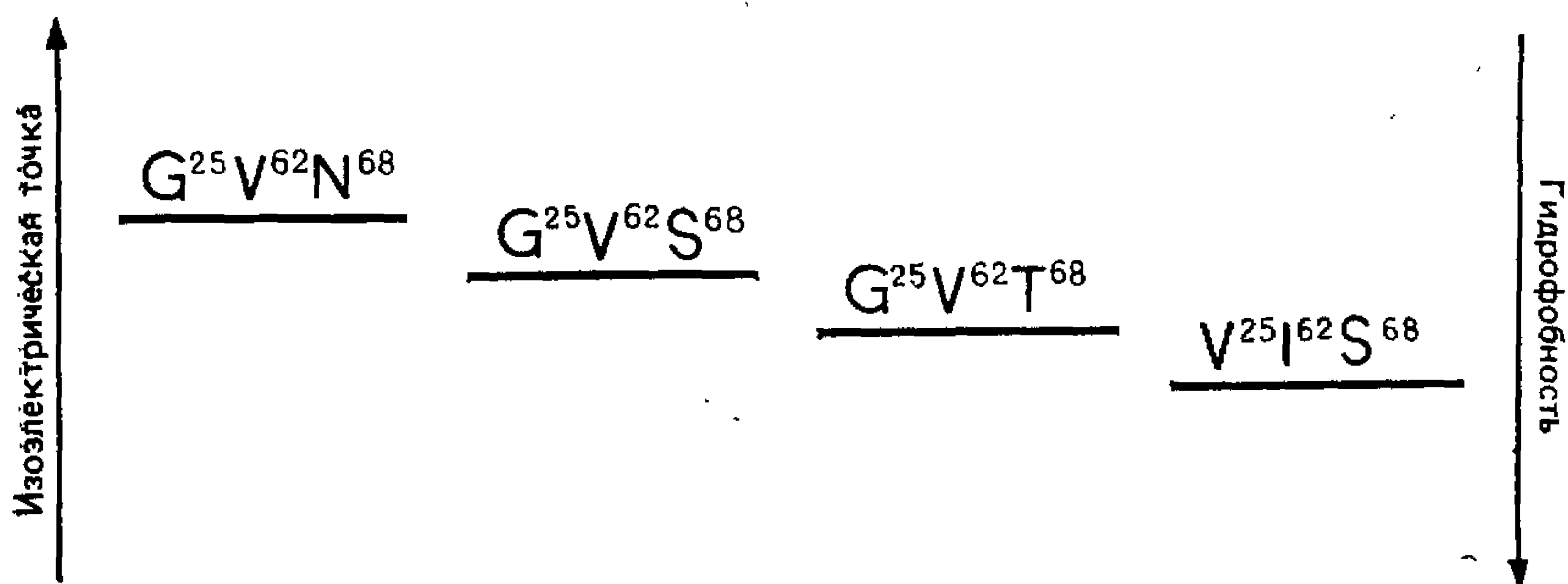


Рис. 3.37. Разделение мутантных гемоглобинов мыши, в которых произошли замены одной нейтральной аминокислоты на другую. *Слева направо*: представлены мутантные формы, содержащие остатки Gly^{25}, Val^{62}, Asn^{68}; Gly^{25}, Val^{62}, Ser^{68}; Gly^{25}, Val^{62}, Thr^{68}; Val^{25}, Ile^{62}, Ser^{68}. Обратите внимание на корреляцию между возрастанием гидрофобности мутантной формы и уменьшением pI. В основу положены данные ИЭФ из работы Witney et al., 1979. (Righetti et al., 1980.)

около 6,5) в растворе, содержащем мицеллы нейтрального детергента тритона X-100, наблюдается уменьшение р*K*, примерно до 0,9 (Savitskii et al., 1978). Я могу предположить, что в нативном гемоглобине мыши на расстоянии нескольких ангстрем от боковых групп аминокислотных остатков в положениях 25, 62 и 68 α-цепи находится положительно заряженная группа (скорее всего остаток лизина). Возрастание гидрофобности аминокислотных остатков в этих положениях приводит к локальному понижению диэлектрической проницаемости и соответственно к понижению эффективного значения $pK_{каж}$ основной группы, вплоть до полного ее депротонирования в области pH=pI в ряду Hb_1—Hb_4 (Righetti, 1979). Тот факт, что в нативном тетрамере замена одной нейтральной аминокислоты на другую сопровождается не очень большим, но заметным изменением pI, сам по себе не вызывает большого удивления. Однако нам удалось разделить мутантные формы с «нейтральной» точечной заменой даже при ИЭФ полностью денатурированных глобиновых цепей, т. е. в таких условиях, когда на значении р*K* не могут сказываться конформационные переходы. Это удалось сделать в экспериментах по изоэлектрическому разделению β- и γ-цепей глобина с целью диагностики талассемии (Righetti et al., 1979; Comi et al., 1979; Saglio et al., 1979; Guerasio et al., 1979). При ИЭФ в геле, содержащем 8*M* мочевину и 3%-ный NP-40, зона, соответствующая γ-цепи, расщепляется на две с pI 6,95, отвечающей G -цепи (глицинсодержащей), и с pI 6,85, отвечающей A -цепи (аланинсодержащей) (рис. 3.38). Эти цепи, отличающиеся друг от друга только природой остатка в положении 136 (Gly или Ala), являются продуктами двух неаллельных локу-

сов, расположенных вблизи структурных генов α- и β-глобиновых цепей. Для объяснения различий в значениях pI, которые наблюдаются при ИЭФ пары нейтральных мутантных форм в присутствии мочевины и неионного детергента, т. е. в таких условиях, в которых белки обладают полностью неупорядоченной структурой, была высказана следующая гипотеза (Righetti et al., 1980). Предполагается, что мицеллы детергента преимущественно взаимодействуют с A_γ-цепью, в частности с ее относительно более гидрофобным участком Met^{133}—Leu^{141}. Это взаимодействие подавляет протонирование остатка Lys^{132}, что приводит к изменению заряда (потере одного протона) в данном фенотипе. Мы предположили, что этот пептидный сегмент A_γ-цепи связывается со слоем Штерна в мицеллах детергента. В качестве альтернативной модели можно допустить включение этого сегмента в гидрофобное ядро мицеллы, подобно тому, как это наблюдалось в случае гемина (Simplicio et al., 1975) или гидрофобных мембранных белков (Hackenberg, Klingenberg, 1980). Ситуация с (A_γ—G_γ)-цепями не представляется уникальной. Аналогичное изменение заряда наблюдалось и для гистонов. Если окажется, что нейтральные замены такого типа с тем же успехом можно обнаруживать и для других белков, то с помощью ИЭФ удастся зарегистрировать вдвое больше генетических вариантов, чем это было до сих пор сделано на основе традиционных электрофоретических методов. По сути дела, это положение уже получило подтверждение на практике (см. 3.3.6 и рис. 3.25).

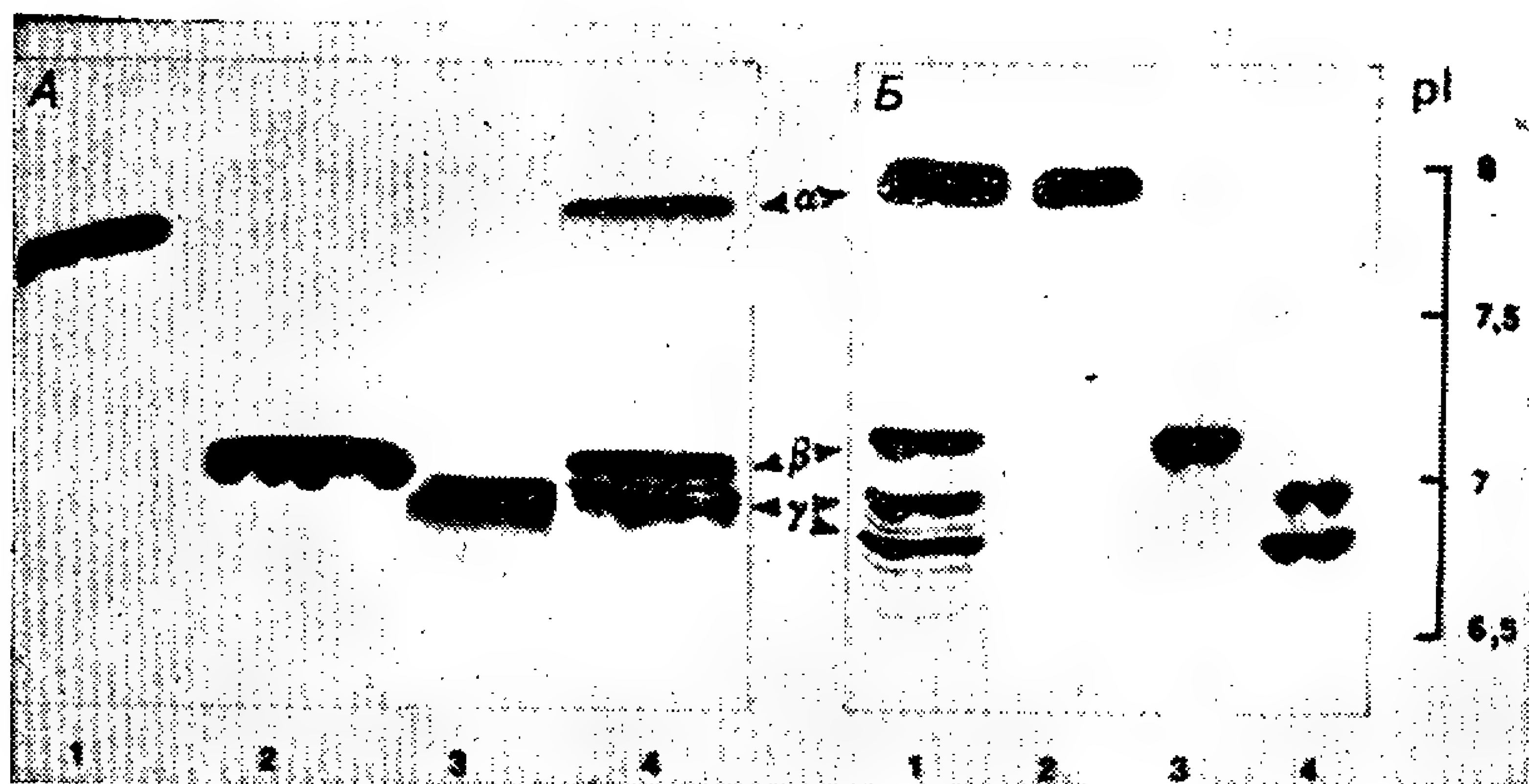


Рис. 3.38. Разделение цепей глобинов человека с помощью ИЭФ в отсутствие (*А*) и в присутствии (*Б*) детергента NP-40. В треках 1, 2, 3 (*А*) и 2, 3, 4 (*Б*) — хроматографически чистые α-, β- и γ-цепи соответственно. В треках 4 (*А*) и 1 (*Б*) — смесь глобиновых цепей. (Saglio et al., 1979.)

3.7. Кривые титрования

Для написания этой главы потребовалось столько усилий, что мне хотелось как-нибудь особо отпраздновать ее завершение. Поэтому я и решил закончить главу рассмотрением одного из вариантов метода двумерного фракционирования, которое, вообще говоря, следовало бы включить в разд. 3.4. Первое сообщение о методе было сделано в 1976 г. на симпозиуме в Гамбурге (Rosengren et al., 1977). Авторы использовали его в качестве, по их выражению, «простого способа выбора оптимального pH для электрофоретического фракционирования». В действительности метод позволяет получить непосредственное изображение на пластине геля кривых титрования всех белковых компонентов смеси.

На рис. 3.39 показана последовательность операций, осуществляемых в процессе получения кривых зависимости подвижности от pH. Готовится пластина ПААГ толщиной 2 мм с желобком посредине (10 см×1 мм), в который можно внести до 150 мкл

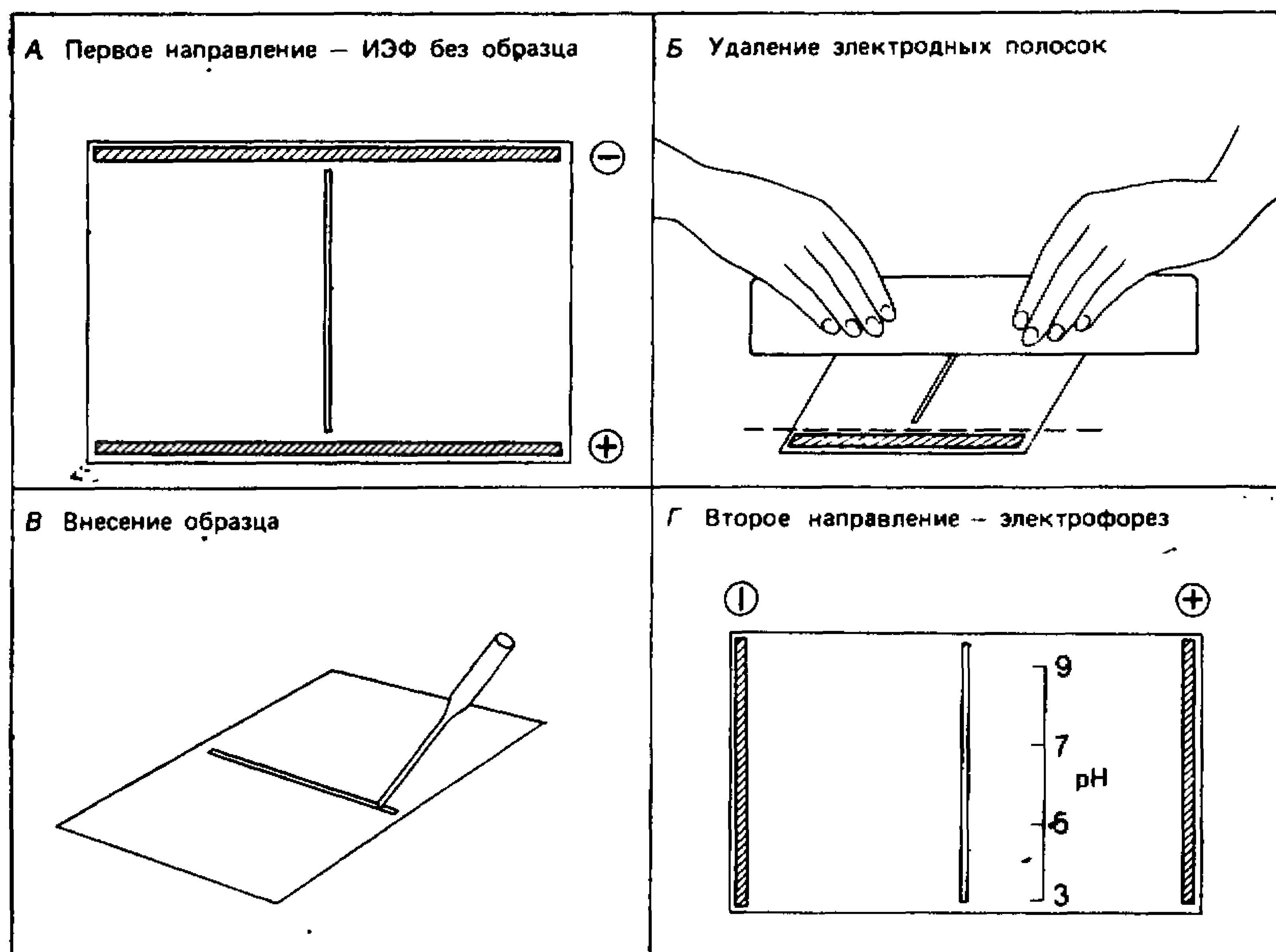


Рис. 3.39. Последовательность операций при получении кривых титрования белков с помощью электрофореза в поперечном градиенте pH. На первой стадии формируется градиент pH с помощью фокусирования смеси амфолитов-носителей (*А*). Затем удаляют электродные полоски (*Б*) и вносят раствор образца в желобок, расположенный перпендикулярно направлению градиента pH (*В*). Электрофорез проводят в направлении, перпендикулярном направлению ИЭФ (*Г*). (Righetti, Gianazza, 1979.)

образца. В настоящее время наборы для получения кривых титрования в 1,5-мм гелях поставляются фирмами LKB Produkter AB (№ 2117-801) и Bio Rad Labs. Первая стадия заключается в ИЭФ смеси амфолитов-носителей, что приводит к формированию стабильного градиента pH. На этой стадии образец не вносится. По окончании ИЭФ электродные полоски вместе с расположенными под ними полосками геля отрезают с помощью длинного ножа (рис. 3.39,*Б*). Это весьма существенный момент, так как при проведении электрофореза во втором направлении на этих участках из-за присутствия 1 *М* кислоты и 1 *М* щелочи выделялось бы слишком много тепла. Новые электроды накладывают перпендикулярно положению электродов первого направления и заполняют желобок раствором анализируемого образца (рис. 3.39,*В*). После этого проводят электрофорез в направлении, перпендикулярном стационарному градиенту pH, обычно при напряжении около 600 В/12,5 см в течение 10—45 мин (рис. 3.39,*Г*). Приведем некоторые примеры применения этого метода.

а. *Генетические варианты.* При фракционировании смеси нормального и мутантного белков можно получить «дифференциальную» кривую титрования и с ее помощью установить, аминокислотная замена какого типа привела к появлению мутантного фенотипа (рис. 3.40). Например, при замене остатка Lys две кривые могут слиться только при pH около 11, а при замене остатка Glu или Asp точка слияния кривых должна находиться около pH 3. Можно также зарегистрировать мутации с изменением знака заряда (например, Lys⟶Glu) или с его сохранением (например, Arg⟶His). Кривые титрования типа теоретических кривых, приведенных на рис. 3.40, удавалось наблюдать экспериментально при фракционировании смесей нормального гемоглобина взрослого человека HbA с такими мутантными формами, как HbS, HbC, Hb Suresnes и HbG Philadelphia (Righetti et al., 1978; Righetti, Gianazza, 1979).

б. *Взаимодействие белок—лиганд.* В работе Krishnamoorthy et al., 1978, были исследованы кривые титрования комплексов метгемоглобин—инозитгексасульфат (ИГС) и метгемоглобин—инозитгексафосфат (ИГФ). Было показано, что комплекс с ИГС стабилен в диапазоне pH 3,7—6,0, а комплекс с ИГФ — при pH 4,5—6,0. Оба комплекса характеризуются значениями константы диссоциации K_d порядка микромолей и в условиях эксперимента стабильны в течение 8—10 мин. При изучении комплекса с 2,3-дифосфоглицератом (K_d которого, как известно, превышает миллимолярный уровень) в диапазоне pH 3—10 наблюдалась только кривая титрования, соответствующая свободному гемоглобину. Это указывает на то, что под действием электрического поля данный комплекс очень быстро разруша-

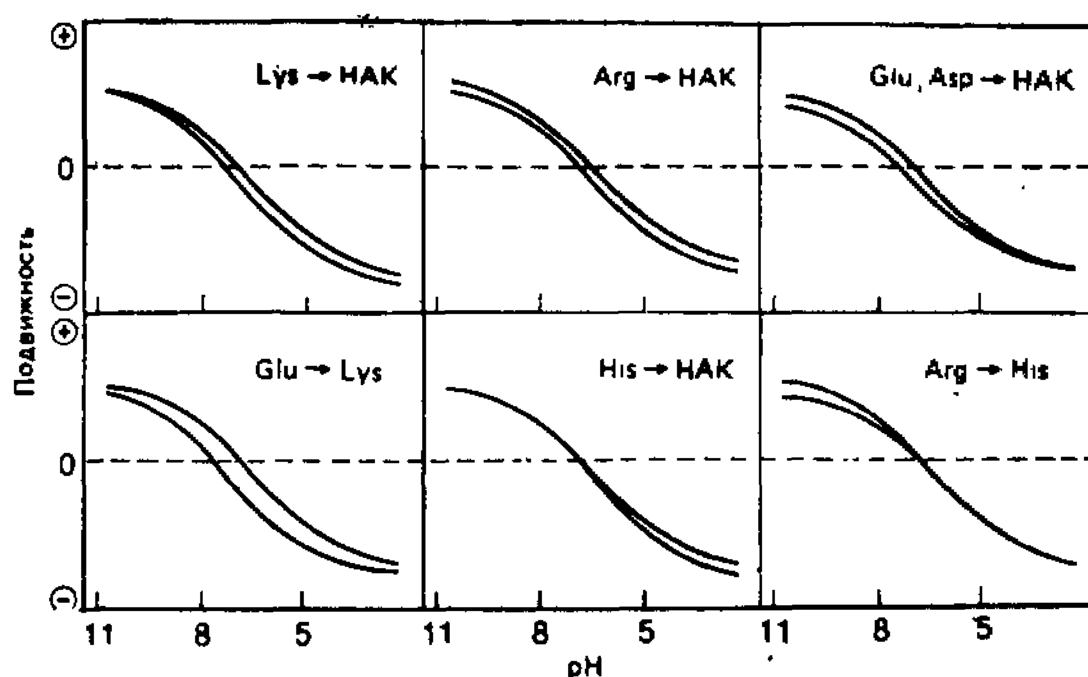


Рис. 3.40. Теоретические кривые титрования нормального гемоглобина и его генетических вариантов, содержащих определенную аминокислотную замену. НАК — нейтральная аминокислота. Штриховые прямые указывают зону нулевой подвижности (внесение образца). (Righetti, Gianazza, 1979.)

ется. Очень неустойчивые интермедиаты, вероятно, можно зарегистрировать, проводя опыты при температуре от −15 до −20 °C, как это описано в работах Perrella et al., 1978, 1979. С помощью рассматриваемого метода двумерного фракционирования удалось продемонстрировать связывание витамина D_3 и его производных с витамин D-связывающим белком из сыворотки крови человека (Constans et al., 1980). Показано, что связывание лиганда вызывает конформационные изменения в структуре апопротеина. Метод позволяет исследовать стехиометрию комплексообразования, а также диапазон pH стабильности комплекса.

в. *Белок-белковые взаимодействия.* Метод получения кривых титрования был использован для изучения взаимодействия между цитохромом b_5 (Cyt b_5) и метгемоглобином (met-Hb) (Righetti et al., 1978b). При фракционировании в геле каждого из этих белков по отдельности наблюдается классическая сигмоидная кривая титрования. В то же время при «титровании» смеси белков происходило сильное размывание картины при pH выше pI для Cyt b_5 и при pH как выше, так и ниже pI для Met-Hb. Наиболее интенсивное взаимодействие белков, судя по всему, происходит при pH 8,0—8,3, что согласуется с представлением о доминирующей роли остатков лизина met-Hb в связывании с карбоксильными группами боковых цепей аминокислотных остатков Cyt b_5. В дополнение к этой работе было исследовано взаимодействие NADH—Cyt b_5 редуктазы и Cyt b_5 с использованием прямой регистрации кривых титрования фермента (Lostanlen et al., 1980). Независимо об использовании методов зимограмм и иммунологических реплик для прямой регистрации

кривых титрования сообщалось в публикации Gianazza et al., 1980. Исследовалось взаимодействие между гемоглобином и гаптоглобином (Hp), а также между свободными α- и β-глобиновыми цепями и Hp. Комплексы типа Hp—Hb устойчивы во всем диапазоне pH 3—10, и это указывает на то, что главную роль в их образовании играют неионные взаимодействия. В то же время свободные β-цепи, вероятно, не образуют прочного комплекса с Hp. При совместном «титровании» α-цепей и Hp наблюдается весьма своеобразный профиль pH-зависимости, указывающий на наличие взаимодействия смешанного типа (неопубликованные данные, полученные совместно с R. Krishnamoorthy, D. Labie и M. Waks).

г. *Кривые титрования в присутствии 8 М мочевины и детергентов.* Изучение зависимости подвижности нативных белков от pH не дает возможности непосредственно выявить все ионизуемые группы белка. Влияние на подвижность оказывают только доступные для растворителя поверхностные функциональные группы, не вовлеченные в межсубъединичные и другие взаимодействия. Поэтому была разработана методика электрофоретического титрования в денатурирующих условиях, например в присутствии 8 М мочевины (Righetti et al., 1979a). В этих условиях многие белки существуют в виде хаотических клубков, происходит разрушение субъединичной структуры и диссоциация нековалентно связанных лигандов и кофакторов, а ранее экранированные заряженные группы белка оказываются доступными для растворителя. Сравнение кривых электрофоретического титрования не связанных с гемом α- и β-глобиновых цепей в 8 М мочевине позволяет «с высоты птичьего полета» увидеть характерные особенности аминокислотного состава этих двух полипептидных цепей. Так, ввиду того что основные различия между α- и β-цепями касаются относительного содержания дикарбоновых аминокислот, их кривые титрования заметно сближаются лишь при pH ниже 3, т. е. в такой области, где различия в подвижности могли бы быть связаны только с различиями в наборе оснóвных аминокислот. Наблюдаются и некоторые отклонения от идеальности, проявляющиеся, в частности, в том, что при pH около 3 кривые полностью сливаются (чего быть не должно), а также в том, что каждая из двух кривых разветвляется при pH несколько выше и несколько ниже pI, вероятно в результате частичной изоэлектрической агрегации и преципитации белков. В то же время проведение процесса при совместном присутствии 8 М мочевины и 1%-ного NP-40 позволяет избежать указанных артефактов. Это, по-видимому, объясняется тем, что связывание детергента с гидрофобными участками полипептидных цепей предотвращает межмолекулярные взаимодействия, которые в отсутствие детергента приводят к преципи-

тации белков вблизи изоточки (Righetti, Gianazza, 1979b, 1980).

д. *Кривые титрования в крупнопористых матрицах.* В работе Bianchi Bosisio et al., 1980, были исследованы возможности проведения электрофоретического титрования в крупнопористых гелях (ПААГ, содержащий 15—50% «сшивки» — бис или ДАТД), при использовании которых можно рассчитывать на практически беспрепятственную электрофоретическую миграцию белков со значениями M_r в диапазоне нескольких миллионов. К сожалению, при работе с ДАТД образуются липкие и непрочные гели, которые содержат до 80—90% незаполимеризовавшегося ДАТД, способного вступать в реакцию с белками. С другой стороны, гели с $C_{бис}$ = (40—50) % оказываются слишком гидрофобными, им свойственны деформация матрицы и отторжение воды. Приемлемым компромиссом можно считать гели

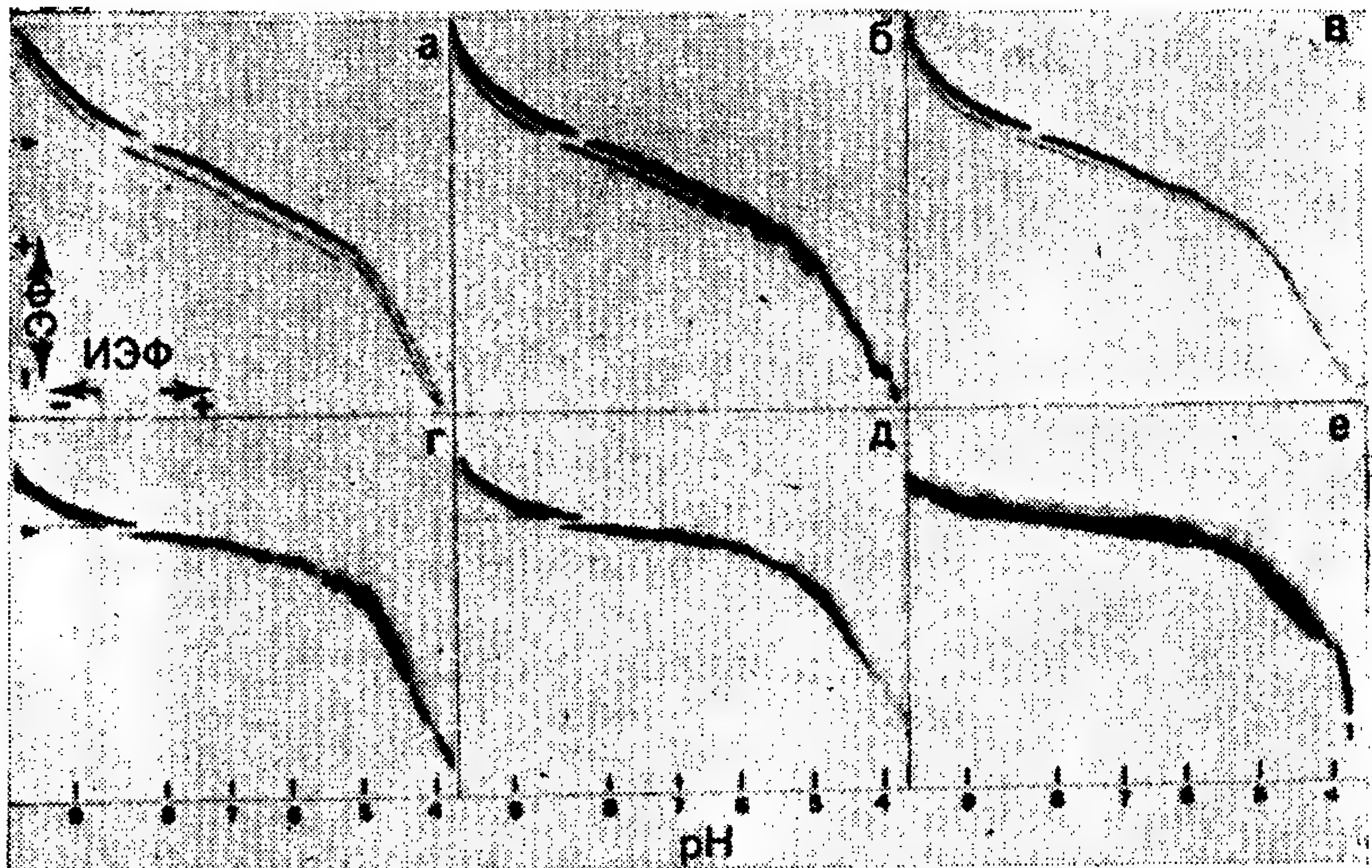


Рис. 3.41. Кривые аффинного титрования лектинов из семян *Ricinus communis*. Состав геля: 6% *T*, 4% $C_{бис}$, 2% амфолинов pH 3,5—10 и по 2 мМ Glu, Asp, Lys и Arg. Содержание лиганда (аллил-α-D-галактозы), использованного в качестве сополимеризующегося компонента в процессе приготовления геля: а — контроль, лиганд отсутствует; б — 10 мкМ; в — 40 мкМ; г — 50 мкМ; д — 70 мкМ; е — 100 мкМ. Во всех случаях в гель вносили 200 мкг белка в объеме 100 мкл. Разделение в первом направлении проводили в течение 80 мин при постоянной мощности 10 Вт, во втором направлении — 20 мин при постоянном напряжении 700 В. В обоих случаях в качестве католита использовали 1 М NaOH, в качестве анолита — 1 М H_3PO_4. Гель термостатировали при 4 °С в термостате типа Lauda KR4. Отметки на (а) и (г) указывают положение зоны внесения образца (зоны нулевой подвижности), двойные стрелки со значками «+» и «—» — полярность электродов и направление на стадиях ИЭФ и ЭФ. (Ek et al., 1980.)

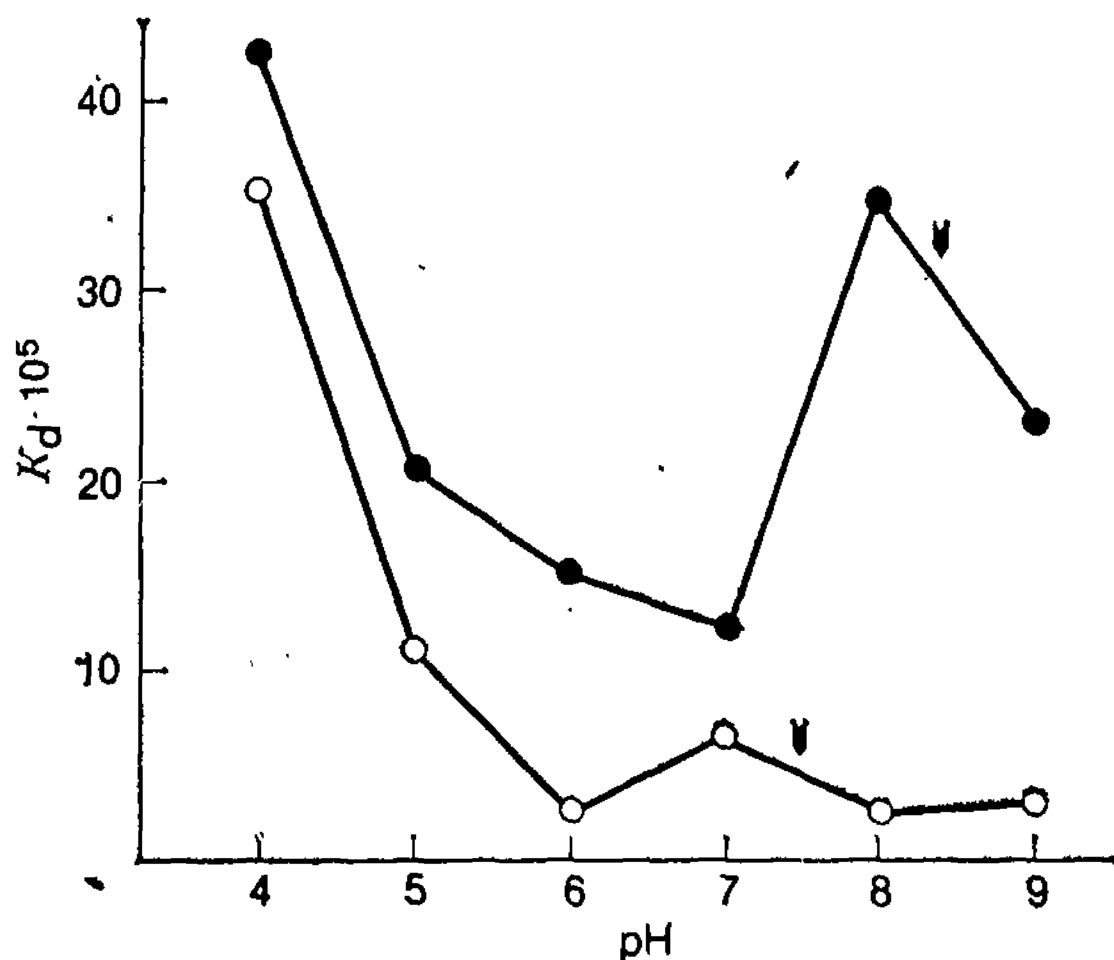


Рис. 3.42. Зависимость константы диссоциации комплекса (K_d) для лектинов *Ricinus communis* (○) и *Lens culinaris* (●) от pH. Использованные значения K_d рассчитаны на основе данных по изменению электрофоретической подвижности при различных pH из кривых аффинного титрования, подобных тем, что показаны на рис. 3.41. Стрелки указывают значения pI для каждого из лектинов. (Ek et al., 1980.)

с $C_{бис}=30\%$, достаточно стабильные и вместе с тем не оказывающие заметного сопротивления миграции белков с M_r до $0{,}5 \cdot 10^6$.

е. *Непосредственное определение pK на основании кривых титрования.* Разработана математическая теория, позволяющая рассчитать pK ионизующихся групп непосредственно из профиля зависимости подвижности от pH (Righetti et al., 1979c; Valentini et al., 1980). Были выведены соответствующие уравнения, связывающие электрофоретическую подвижность со степенью ионизации катионов, анионов или простейших амфолитов. В случае неамфотерных ионов для определения значений pK_C или pK_a достаточно только определить значение pH ($pH_{1/2}$), соответствующее половинной (по отношению к максимальной) подвижности к катоду или аноду соответственно. Для амфотерных молекул значение $pH_{1/2}$ необходимо скорректировать с учетом влияния степени ионизации по второму заряду противоположного знака на подвижность рассматриваемого типа («анодную» или «катодную»).

ж. *Определение K_d из кривых титрования.* Одно из последних приложений метода получения кривых зависимости подвижности от pH — определение констант диссоциации (K_d) комплексов типа белок—лиганд и исследование их pH-зависимости. Для этого используется ряд методических приемов, разработанных в свое время для аффинного электрофореза (Horejsi, 1979).

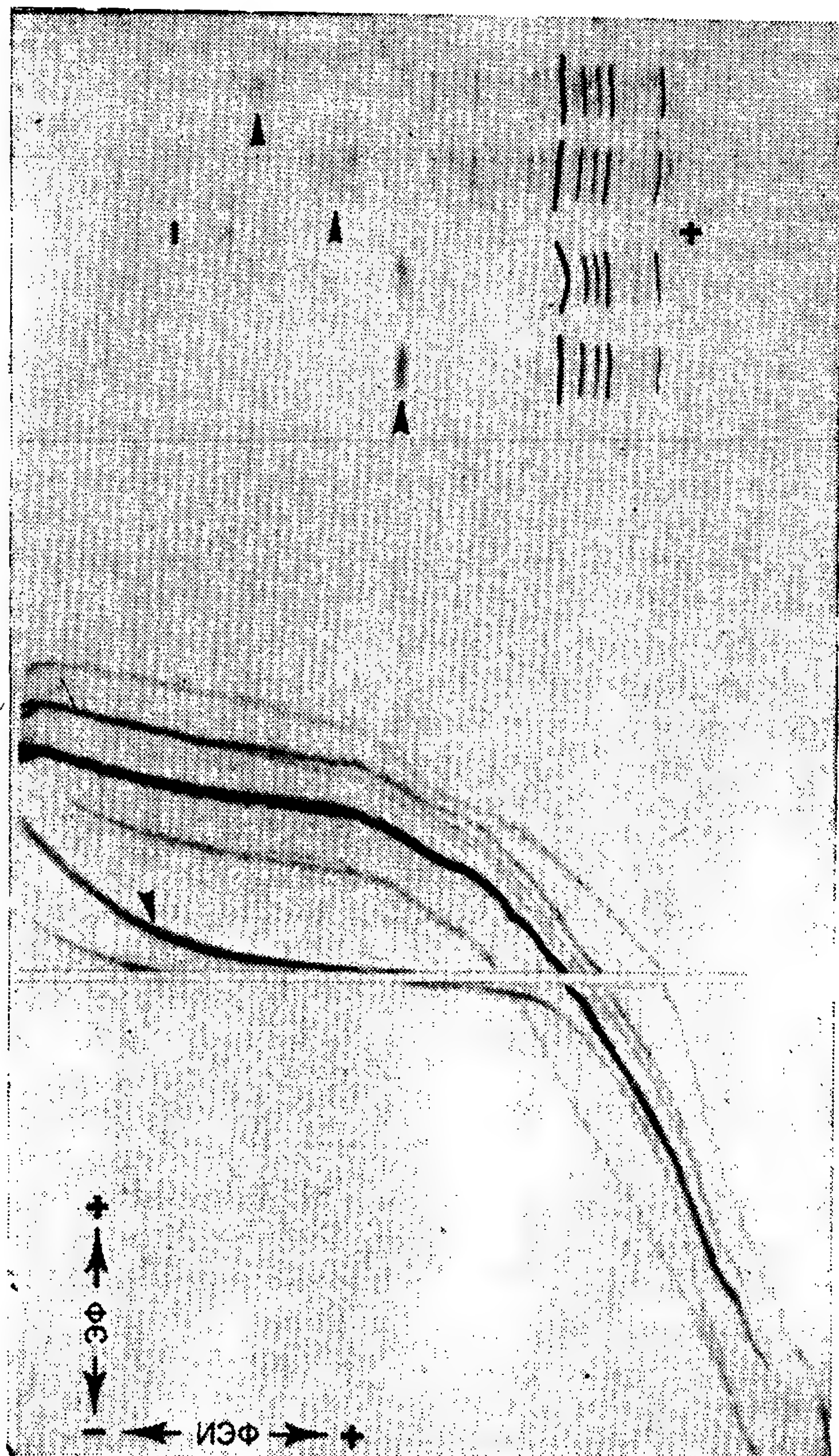


Рис. 3.43. Картина обычного равновесного ИЭФ (вверху) и кривые титрования (внизу) карбоангидразы из эритроцитов быка в диапазоне pH 3,5—9,5. Условия получения кривых титрования: 1-е направление — 10 Вт, 50 мин; 2-е направление — 700 В, 15 мин. Стрелка указывает на кривую титрования одного из изоферментов, которая в щелочной области имеет очень пологую форму. При внесении образца в гель (при обычном ИЭФ) со стороны катода этот компонент образует диффузную зону (см. стрелки у двух верхних треков на профиле обычного ИЭФ). В то же время при внесении образца в область pH ниже значения pI этого компонента он фокусируется в виде узкой зоны (см. стрелки у двух нижних треков на профиле обычного ИЭФ). Двойные стрелки со значками «+» и «—» в левом нижнем углу показывают направление и полярность электродов на стадиях ИЭФ и ЭФ (Ek, 1981.)

Высокомолекулярный лиганд просто включают в состав геля, а низкомолекулярный ковалентно «пришивают» к матрице. При возрастании концентрации лиганда в геле наблюдается постепенное pH-зависимое «запаздывание» кривой титрования. Построив график зависимости снижения подвижности белка от концентрации лиганда в геле, можно рассчитать значение K_d при любом фиксированном pH. Этот метод был разработан при изучении связывания гликогена с фосфорилазами *a* и *b*, голубого декстрана с некоторыми дегидрогеназами и сахаров с лектинами (Ek et al., 1980; Ek, Righetti, 1980). В качестве примера на рис. 3.41 приведены такие кривые «аффинного титрования», отражающие связывание лектинов из семян *Ricinus communis* с аллил-α-D-галактозой, которая была включена в состав геля путем сополимеризации с акриламидом. Можно определить значение K_d при любом pH (обычно при шести разных значениях pH от 4 до 9), а затем построить график зависимости K_d от pH (рис. 3.42).

В заключение отметим, что метод кривых титрования может предоставить очень широкие возможности для изучения некоторых физико-химических параметров белков, а также динамических аспектов их взаимодействия с лигандами. С тем, как практически получают кривые электрофоретического титрования белков, можно познакомиться в работах Ek, 1981, и Righetti, Gianazza, 1981. Интересный пример применения метода проиллюстрирован на рис. 3.43. Давно было известно, что некоторые белки при их внесении в гель поблизости от анода фокусируются в виде очень узких зон, а при внесении у катода — в виде диффузных зон (или наоборот). Объяснить это явление в общем случае не удавалось; предполагали, что оно может порождаться взаимодействием белков с амфолитами-носителями определенного диапазона. На самом деле его легко объяснить при рассмотрении рис. 3.43, на котором представлены кривые титрования форм карбоангидразы из эритроцитов быка, а в верхней части — картины равновесного ИЭФ. Многие изоферменты характеризуются достаточно крутыми кривыми зависимости подвижности от pH вблизи pI и поэтому при обычном ИЭФ фокусируются в виде узких зон независимо от места нанесения образца (у катода или у анода). В то же время для двух наиболее оснóвных изоферментов кривые титрования имеют очень пологую форму при pH выше pI и более крутую — при pH ниже pI. Соответственно оба изофермента, будучи внесены со стороны анода, быстро фокусируются в равновесные узкие зоны. При внесении со стороны катода они образуют диффузные зоны, удаленные от области истинных значений pI, поскольку скорость миграции этих компонентов к равновесному положению значительно меньше, чем у других изоферментов.

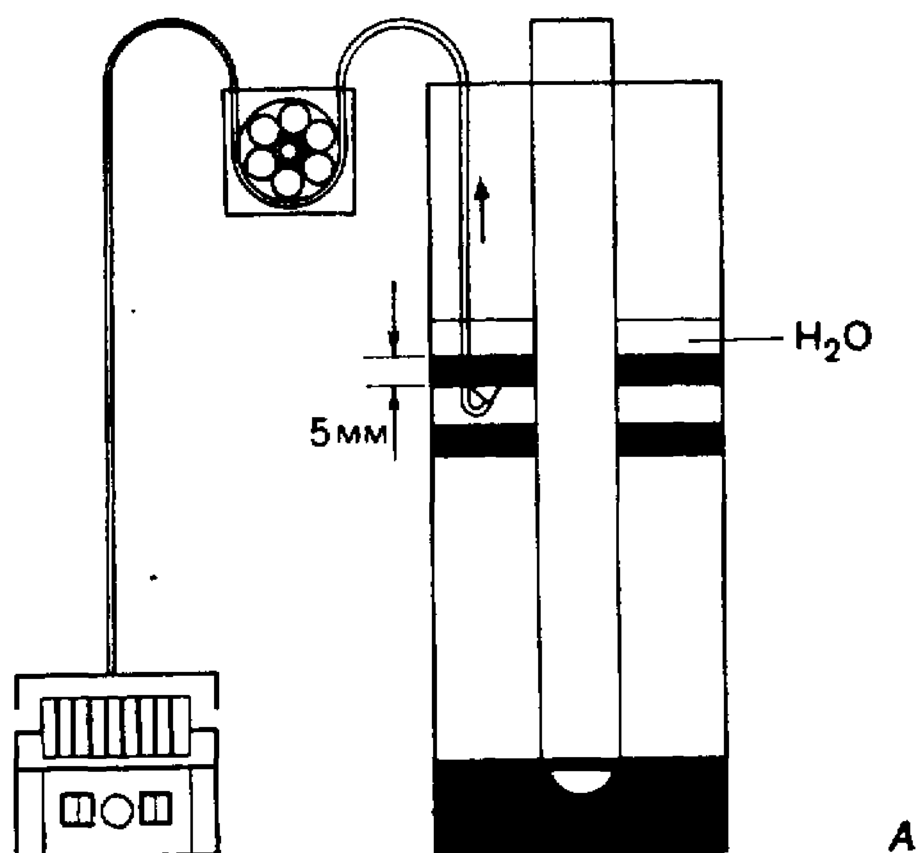
ГЛАВА 4

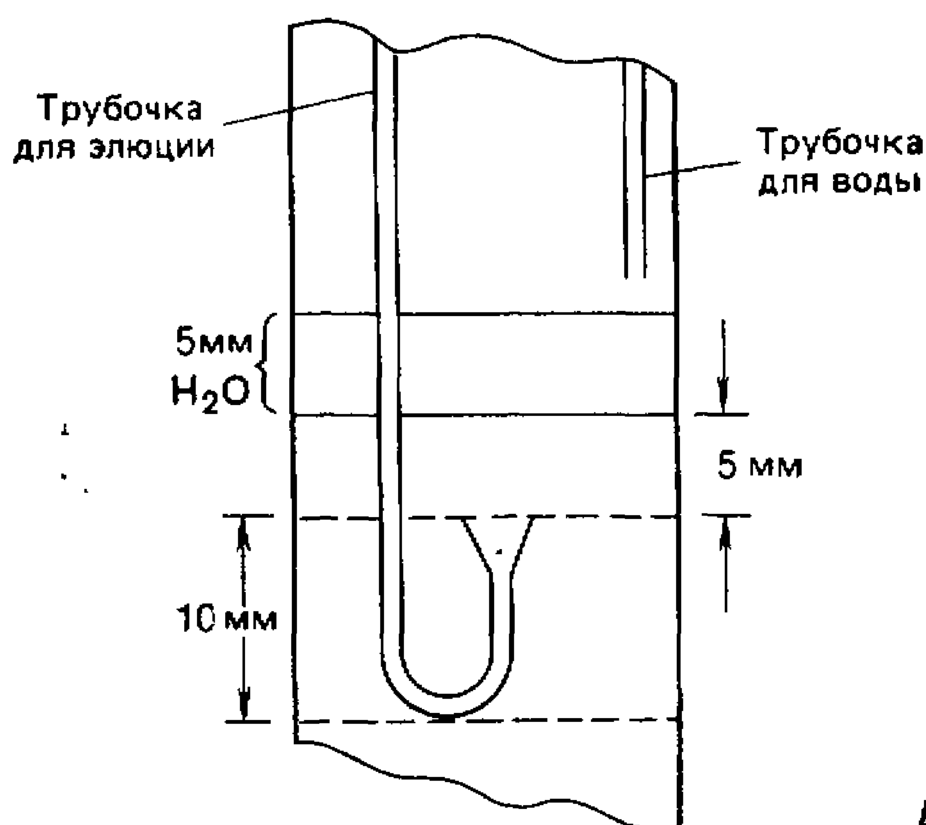
Общие экспериментальные аспекты

4.1. Изоэлектрическая преципитация

Одним из основных недостатков ИЭФ в жидкой среде является преципитация некоторых относительно малорастворимых белков в изоточке. При выпадении осадка образовавшиеся первоначально небольшие частицы слипаются и хлопьями постепенно оседают вниз по всей длине колонки. Поэтому картина разделения часто оказывается испорченной из-за налипания осадка на стенках колонки, искажения градиента плотности и загрязнения соседних белковых зон. Иногда преципитация и выход белка из зоны его pI сопровождается растворением белка, который после этого мигрирует обратно, к прежнему положению, где снова начинает выпадать в осадок. Так может возникнуть некое квазиравновесное состояние, при котором белок присутствует в различных «агрегатных состояниях» на достаточно протяженном участке градиента pH. Во многих случаях преципитации удается избежать, понижая загрузку белка или повышая рабочую концентрацию амфолитов-носителей. В обоих случаях недостатком такого решения является неэкономичное соотношение белок : амфолины, поэтому лучше использовать различного рода добавки (разд. 4.2). В тех случаях, когда все же не удается подавить изоэлектрическую преципитацию, можно воспользоваться некоторыми приемами, позволяющими избежать ее нежелательного влияния на фракционирование в вертикальном градиенте плотности. Один из этих приемов связан с выбором такой полярности электродов, при которой выпадающие в осадок (примесные) компоненты фокусируются в нижней части колонки, а фокусирование искомого белка происходит вне зоны преципитации, как можно ближе к верхней части колонки. В этой ситуации обычный способ опорожнения колонки (т. е. элюция через низ) не подходит, поскольку осадок может забивать сливную трубку, а искомые белковые зоны могут заметно размываться. Более приемлемым в этом случае представляется извлечение сфокусированного образца через верх колонки. Эта операция, легко осуществимая при работе с колонками

фирмы LKB, схематически показана на рис. 4.1. По окончании ИЭФ отключают ток и перекрывают нижний клапан, соединяющий тяжелый электродный раствор с центральным платиновым электродом (см. рис. 2.2). Через верхнее отверстие, предназначенное для наслаивания градиента, в колонку вводят трубочку на 1 см ниже верхнего электрода и откачивают верхний электродный раствор. Для извлечения образца используют другую пластиковую трубочку, которую перед введением в колонку фланцуют с помощью металлического стержня, заточенного под углом 60 °, слегка нагревая конец трубочки на пламени спички или зажигалки. Нагревая таким же образом трубочку на рас-





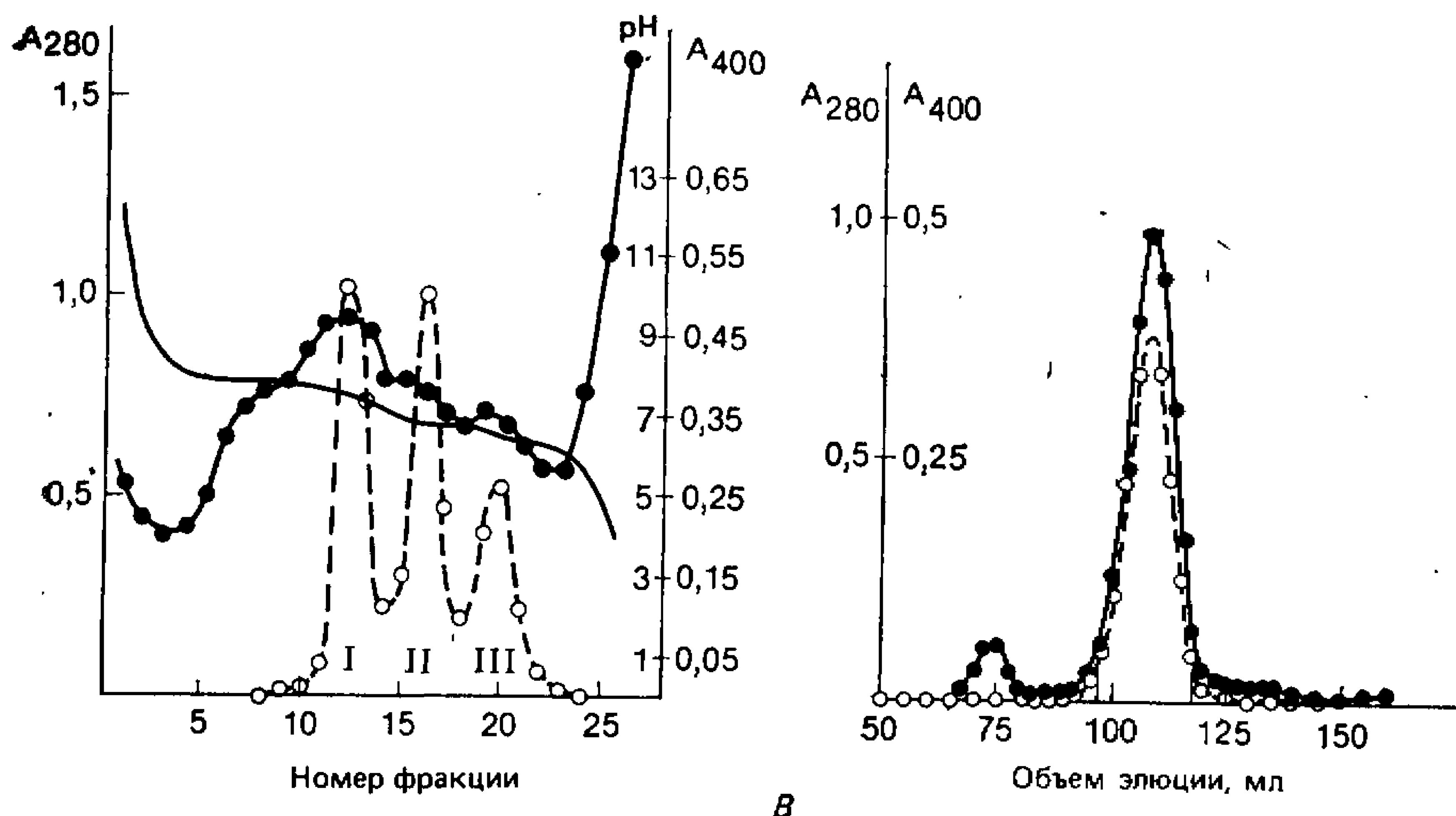


Рис. 4.1. Элюция после ИЭФ, сопровождающегося изоэлектрической преципитацией, в вертикальном градиенте плотности в колонке фирмы LKB. Рассматривается вариант извлечения компонентов, фокусирующихся вне зоны преципитации (*А*). В этом случае проводят ступенчатую элюцию начиная с верхних слоев, через U-образную трубочку, расширяющуюся под углом 60° на конце. Эту трубочку вводят через верхний отросток колонки (обозначенный цифрой 5 на рис. 2.2) и погружают на глубину около 5 мм в слой градиента. С помощью еще одной трубочки поверх градиента наслаивают слой воды толщиной 5 мм (*Б*). После этого, как показано на рис. *А*, первую порцию градиента откачивают с помощью перистальтического насоса со скоростью 100—120 мл/ч. Эту процедуру повторяют необходимое число раз. На рис. *В* приведены два примера фракционирования. — pH, ● A_{280}, ○ A_{400}. (С любезного разрешения LKB Produkter AB.)

стоянии 1 см от края, ее загибают в форме U-образной петли. Петлю опускают в колонку на 5 мм ниже уровня элюируемой жидкости. Для того чтобы обеспечить полное смывание образца со стенок колонки, перед извлечением каждой фракции поверх нее с помощью первой трубочки наслаивают 5-мм слой дистиллированной воды. Через петлю откачивают 5-мм слой градиента и покрывающий его 5-мм слой воды с помощью перистальтического насоса со скоростью 120 мл/ч. После этого петлю опускают еще на 5 мм, снова наслаивают 5-мм слой воды и откачивают еще одну порцию. Эти операции повторяются многократно, до тех пор пока не будут извлечены все нужные фракции. Дополнительные экспериментальные подробности приведены в методическом руководстве фирмы LKB I-8100-E04.

Этот прием был использован в работе Janson, 1972, где после фокусирования 7,3 г белка в колонке фирмы LKB объемом 440 мл с помощью ступенчатой элюции «через верх» удава-

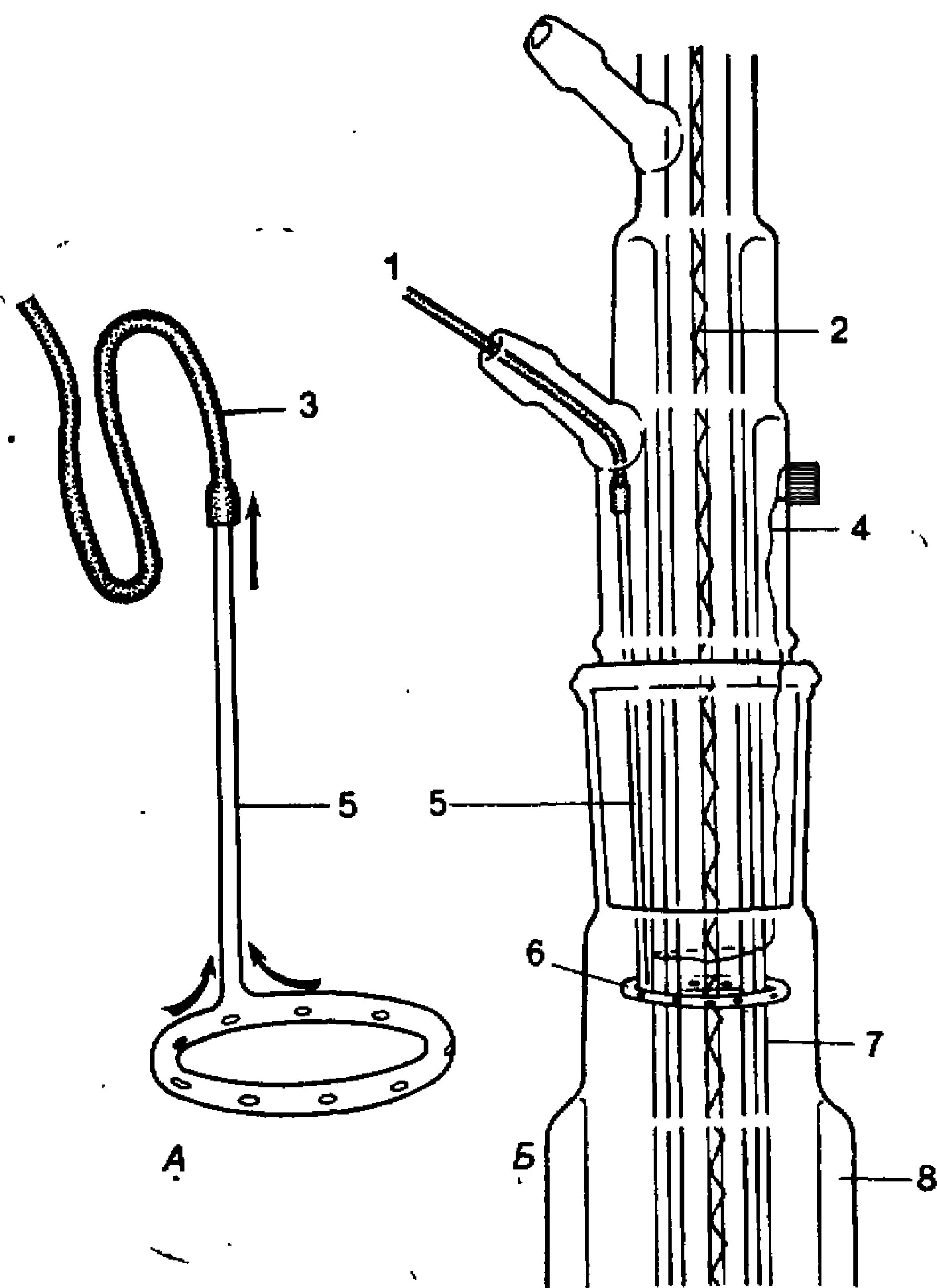


Рис. 4.2. Извлечение из колонки образцов, которые при ИЭФ в градиенте плотности подвергаются изоэлектрической преципитации. Во внутреннее пространство колонки при сборке вводят кольцо из перфорированной стеклянной трубки с отводом (*А*). Кольцо помещают в верхней части колонки или в предполагаемой области преципитации (*Б*). По мере появления осадка его откачивают через трубочку, присоединенную к отводу кольца. 1 — к насосу, 2 — нижний электрод, 3 — трубочка, 4 — верхний электрод, 5 — отвод, 6 — перфорированное кольцо, 7 — рубашка внутреннего охлаждения, 8 — рубашка наружного охлаждения. (Rathnam, Saxena, 1970.)

лось с хорошим разрешением выделить три изоформы α-глюкозидазы из *Cytophaga johnsonii*. Характерно, что ИЭФ в данном случае было самым первым препаративным этапом выделения ферментов, и тем не менее только с его помощью удалось достичь 300-кратной очистки (от неактивных белков) с выходом по α-глюкозидазной активности около 20%. Впрочем, иногда экспериментатору приходится сталкиваться и с обратной задачей, т. е. не с элюцией растворимого белка в присутствии преципитирующих примесей, а с извлечением белка, который сам подвергается изоэлектрической преципитации. Остроумное решение такой задачи было предложено в работе Rathnam, Saxe-

па, 1970. Белки, преципитирующие в ходе ИЭФ, извлекаются с помощью введенного внутрь колонки кольца из стеклянной трубки с отверстиями [рис. 4.2,*А*]. В той части кольца, которая примыкает к точке соединения с вертикальной трубкой, отверстия имеют наименьший диаметр. По мере удаления от этой точки диаметр отверстий постепенно увеличивается таким образом, чтобы обеспечить одинаковую скорость всасывания жидкости по всему периметру кольца. Вертикальная трубка припаяна под небольшим тупым углом к плоскости кольца, что помогает сохранить его горизонтальное положение при перемещении вверх и вниз по колонке. Как показано на рис. 4.2,*Б*, при сборке колонки кольцо следует помещать около верхнего электрода, а еще лучше в предполагаемой области преципитации. По мере появления осадка в ходе ИЭФ его отсасывают через трубку, присоединенную к кольцу. С необходимыми предосторожностями эту операцию можно проводить, не отключая напряжения, чтобы не вызвать искажений на других участках градиента. Если уровень верхнего электродного раствора начнет опускаться ниже платинового электрода, то через другую трубочку можно залить дополнительную порцию электролита. Обе эти операции можно проводить одновременно.

При ИЭФ в горизонтальном слое с «капиллярной» стабилизацией при помощи гранулированных матриц типа сефадекса, полиакриламида, агарозы или Pevikon (см. разд. 2.2.3) изоэлектрическая преципитация не представляет столь серьезной опасности. В то же время следует иметь в виду, что при обычных для ИЭФ низкой ионной силе и высокой белковой загрузке преципитация белка может происходить в интервале $\pm 1/2$ ед. pH от истинного значения pI, что соответственно может привести к «размыванию» зон и ухудшению разрешения. Более того, в отдельных случаях образующийся плотный осадок может забить поры в геле, что приведет к неравномерному распределению электрического поля и искажению сфокусированных зон. В принципе изоэлектрическую преципитацию можно отчасти подавить, проводя ИЭФ при высокой концентрации соли (до 0,1 *М* NaCl), как было предложено в работе Righetti, Chrambach, 1978. Однако для этого необходимы большие электродные резервуары, обеспечивающие постоянное обновление электролитов. Предлагалось также использовать полиакриламидный гель, полученный при сополимеризации с цвиттерионами типа MAPS [внутренняя соль (3-сульфопропил)диметил(3-метакриламидопропил)аммония) (Hjelmeland et al., 1981). Все же следует отметить, что это включенное в состав геля вещество вряд ли способно действительно увеличить ионную силу или сбалансировать процесс ИЭФ по току. Наилучшим способом, позволяющим контролируемо повышать ионную силу в геле и свести к мини-

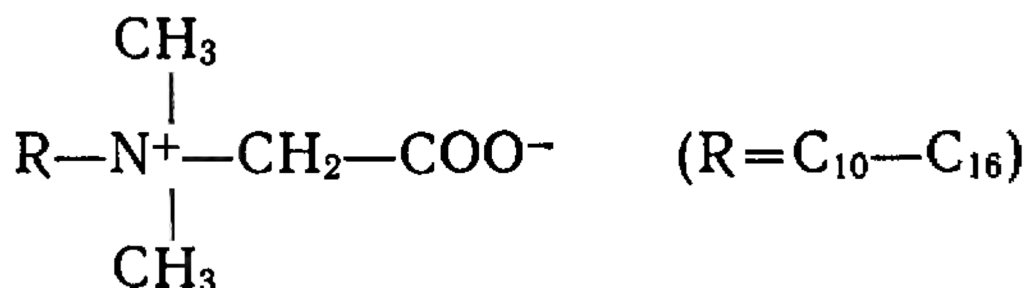
муму изоэлектрическую преципитацию даже при значительной белковой загрузке, является проведение ИЭФ в иммобилизованном градиенте pH (см. разд. 1.11.7) (Bjellqvist et al., 1982a,b).

4.2. Некоторые добавки при ИЭФ

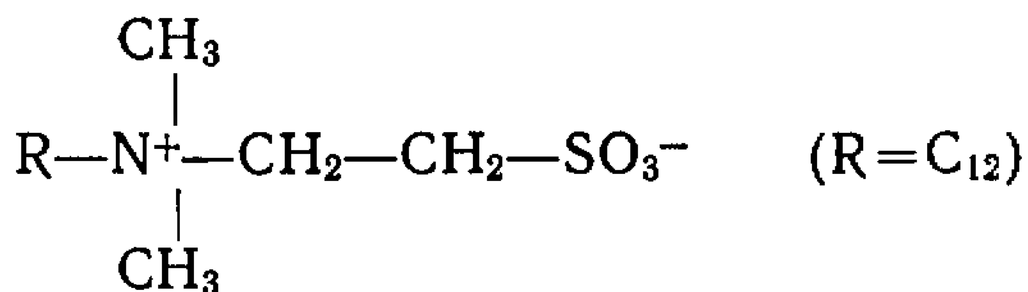
Изоэлектрическую преципитацию часто удается полностью или частично подавить при введении соответствующих добавок (Vesterberg, 1970). Некоторые из них помимо стабилизации и солюбилизации сфокусированных зон уменьшают различия в осмолярности по всему градиенту, возникающие за счет фокусирования амфолитов. Повышая общую осмолярность среды, добавки такого рода снижают опасность образования слоя «чистой воды». Для солюбилизации белков использовались мочевина и формамид в концентрации до 4 М. Однако при использовании этих добавок следует проявлять определенную осторожность, поскольку они могут заметно изменить физико-химические свойства некоторых, в особенности мультимерных, белков. С успехом применяются также неионные детергенты в концентрации от 0,1 до 5%. Использование детергентов особенно эффективно для поддержания растворимости мембранных белков. В настоящее время под различными коммерческими наименованиями выпускается целый ряд детергентов этого типа, таких, как Tween 80, Emasol, Brij 39, Triton X-100 (Sigma Chemical Co.). Для солюбилизации сывороточных липопротеинов применяли 33%-ный этиленгликоль (Kostner et al., 1969) или тетраметилмочевину (Gidez et al., 1975). В некоторых случаях предлагалось использовать комбинации нескольких добавок (Wadström, 1975). Оказалось, например, что совместное применение мочевины и тритона X-100 весьма эффективно при фокусировании мембранных белков эритроцитов. Аналогичные результаты были получены и в работе Bhakdi et al., 1975. Подчеркивалась также необходимость использования высокоочищенных детергентов, поскольку примеси, которые содержатся во многих препаратах неионных детергентов, могут отрицательно сказываться на ходе фракционирования (Wadström, 1975). Так, в случае детергентов типа тритона X-100 автор предложил использовать продукт фирмы Serva категории «сцинтилляционный». На сегодняшний день совместное применение 9 М мочевины и 2%-ного нонидета NP-40 или тритона X-100 является широко распространенной процедурой при ИЭФ сложных смесей клеточных или мембранных белков, особенно на первом направлении двумерного фракционирования (O'Farrell, 1975; Whalen et al., 1976; Friesen et al., 1976; Zechel, 1977; Schmidt-Ullrich, Wallach, 1977). Мочевина способствует диссоциации агрегатов и субъединичных структур, а также раскручиванию полипептидных цепей и тем самым вы-

свобождению нековалентно связанных кофакторов. Неионные детергенты ответственны преимущественно за разрушение гидрофобных контактов.

По сообщению Jacobs, 1971, дополнительные проблемы при ИЭФ могут возникать из-за окисления цистеина и метионина до цистеиновой кислоты и метионинсульфоксида. Этого можно избежать, проводя ИЭФ в присутствии антиоксидантов, таких, как тиодигликолевая или аскорбиновая кислоты. Судя по всему, последняя является более эффективным антиоксидантом, а также предотвращает возможные химические модификации остатков тирозина и аргинина (Jacobs, 1973). В случае тиолзависимых ферментов их активность удается сохранить, работая в присутствии низких концентраций (около 10^{-4} *M*) меркаптосоединений (Wadström, Hisatsune, 1970a,b). Для этих целей с успехом использовали 2-меркаптоэтанол, 2,3-димеркаптопропанол и дитиотреитол или его изомер дитиоэритритол (Cleland, 1964). Было установлено (Allen, Huphries, 1975), что при работе с оболочками жировых капелек молока или с мембранами эритроцитов человека целесообразно включать в состав сахарозного градиента плотности цвиттерионные поверхностно-активные вещества, например алкилбетаины типа Empigen BB:



(поставляется отделением Marchon Division фирмы Albright, Wilson Ltd.) или сульфобетаины типа Sulphobetaine DLH:



(поставляется фирмой Texilana Corp.). Эти детергенты весьма эффективно солюбилизируют мембраны при низких концентрациях (5—30 мМ или 0,1—0,5%) в очень мягких условиях. Они, как правило, не инактивируют ферменты (исключение составляет ацетилхолинэстераза из эритроцитов, которая инактивируется бетаиновым детергентом, но при этом устойчива к сульфобетаинам). Устойчивость ферментов по отношению к цвиттерионным детергентам выгодно отличает последние от анионных детергентов типа ДДС-Na, оказывающих сильное денатурирующее воздействие на любые белки. Цвиттерионные детергенты можно использовать в сочетании с ИЭФ, поскольку их рабочая

концентрация может быть достаточно мала; молекулы этих реагентов в целом электрически нейтральны, р*K* заряженных групп находятся вне пределов обычного интервала фокусирования pH 3—10. При анализе полиморфизма шести компонентов системы комплемента с помощью гелевого ИЭФ (Alper et al., 1975) в гель вводили 0,2 *M* таурин. Таурин ($NH_3^+—CH_2—CH_2—SO_3^-$) также имеет цвиттерионную природу, он не заряжен во всем рабочем диапазоне pH фокусирования и, таким образом, может повышать осмотическое давление в геле, практически не сказываясь на общей концентрации электролитов или на вязкости жидкой фазы. Недавно было предложено использовать смесь неионных и цвиттерионных детергентов для полной солюбилизации мембранных белков. Так, в работе Hjelmeland et al., 1979, микросомы печени солюбилизировали в 1%-ном тритоне X-100 и 1%-ном SB_{14} (N-тетрадецил-N, N-диметил-3-амино-1-пропансульфоновая кислота, или zwittergent ТМ3-14 фирмы Calbiochem) и фокусировали растворенные белки в геле, содержавшем по 0,05% каждого из этих детергентов. При помощи этой смеси детергентов удается добиться полной солюбилизации мембранных белков, которая, судя по всему, сопровождается частичной потерей их биологической активности. Это противоречит прежним данным (Allen, Humphries, 1975), которые, как можно думать, были получены с применением слишком низких концентраций SB_{14}, недостаточных для полного растворения мембранных белков. Согласно данным Gonenne, Ernst, 1978, для полной солюбилизации соотношение детергент : белок должно превышать 10 : 1. Денатурирующее действие SB_{14}, так же как и других представителей класса н-алкил-цвиттерионов, определяется гибкостью углеводородного «хвоста» молекулы детергента (Hjelmeland et al., 1978). На рис. 4.3 приведены структурные формулы наиболее распространенных неионных и цвиттерионных детергентов, которые можно использовать для ИЭФ (Hjelmeland, Chrambach, 1981). Детергенты класса тритонов характеризуются довольно низким значением критической концентрации мицеллообразования (0,075 мМ для тритона N-101 и 0.240 мм для тритона X-100), высокой степенью агрегации (140—150 молекул на мицеллу) и соответственно высокой массой мицелл (90 000 для тритона X-100), а также значительным стоксовым радиусом (5 нм для мицелл тритона).

Таким образом, при фокусировании в 9 М мочевине и 2%-ном тритоне X-100 (или NP-40) следует учитывать, что вязкость такого раствора очень высока, а, следовательно, скорость миграции компонентов по направлению к своим равновесным положениям относительно низка. Поэтому время фокусирования в этих условиях следует увеличить (по крайней мере вдвое по сравнению со временем ИЭФ в геле без добавок). Кроме того, край-

Структурная формула	Химическое или торговое название
Анионные детергенты	
	Додецилсульфат натрия
	Холат натрия
	Дезоксихолат натрия (ДОХ)
	Таурохолат натрия
Катионные детергенты	
	Цетилтриметиламмонийбромид (цетавлон)
Цвиттерионные детергенты	
	Цвиттергент 3-14
	ХАПС
	Лизофосфатидилхолин
Неионные детергенты	
$(O-CH_2-CH_2)-OH$	Луброл PX
$(O-CH_2-CH_2)-OH$	Тритон X-100
$(O-CH_2-CH_2)-OH$	Тритон N-101
$N \rightarrow O$	Аммоникс LO
Glc-Glc-Gal-Xyl -O	Дигитонин
	Октилглюкозид

Рис. 4.3. Структурные формулы некоторых наиболее распространенных детергентов, в том числе цвиттерионных и неионных детергентов, пригодных для использования при ИЭФ. ХАПС — 3-[(-холамидопропил) диметиламмоний]-1-пропилсульфонат. (Hjelmeland, Chrambach, 1981.)

не гидрофобные мембранные белки могут оказаться полностью включенными внутрь мицелл тритона, что приведет к образованию комплексов с очень большим значением стоксова радиуса. Один из примеров образования такого рода структур проиллюстрирован на рис. 4.4 (Hackenberg, Klingenberg, 1980). Видно, что димерный белок — переносчик ADP и ATP из митохондрий сердца полностью включен в эллипсоидную мицеллу со стоксовым радиусом 6,5 нм, содержащую около 150 молекул тритона. Миграция к изоточке таких крупных эллипсоидных частиц будет

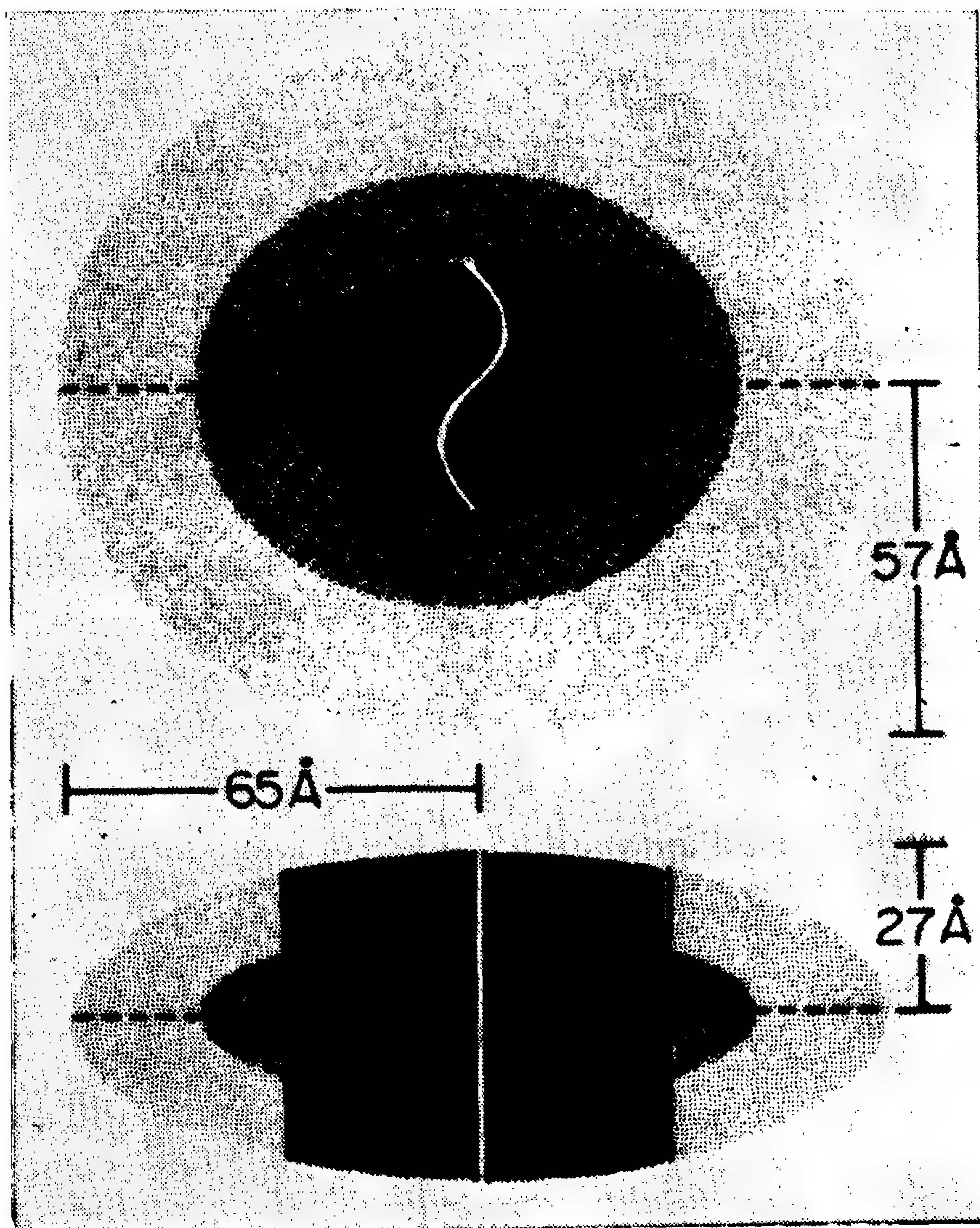


Рис. 4.4. Геометрическая модель комплекса карбоксиатрактилат (КАТ)—белок—тритон. Предполагается, что молекула белка полностью входит внутрь эллипсоидной мицеллы, состоящей примерно из 150 молекул тритона и около 16 фосфолипидных остатков. Из-за увеличения размера малой оси эллипсоида значение стоксова радиуса мицелл тритона при включении белка возрастает от 5,3 до 6,5 нм. (Hackenberg, Klingenberg, 1980.)

сильно затруднена, особенно при проведении ИЭФ в матрице с выраженными молекулярно-ситовыми свойствами. Кроме того, было обнаружено, что подобные детергенты связываются с амфолитами-носителями, особенно в щелочном диапазоне pH (Gianazza et al., 1979), поэтому при окрашивании геля приходится проводить длительное вымачивание в смеси ТХУ—изопропанол для разрушения и вымывания мицелл детергента. Методы быстрого окрашивания (коллоидный раствор CBB G-250 в 12%-ной ТХУ) для детергентсодержащих гелей непригодны, поскольку тройной комплекс краситель—детергент—амфолиты необратимо выпадает в осадок прямо в геле (Righetti, Chillemi, 1978). Интересно было бы попытаться использовать другие детергенты, например типа октилглюкозида, обладающего очень небольшой мицеллярной массой — около 2000—3000 (Helenius, Simons, 1975; Tanford, Reynolds, 1976).

Для диссоциации прочных комплексов успешно использовались такие дезагрегирующие агенты, как 50%-ный диметил-

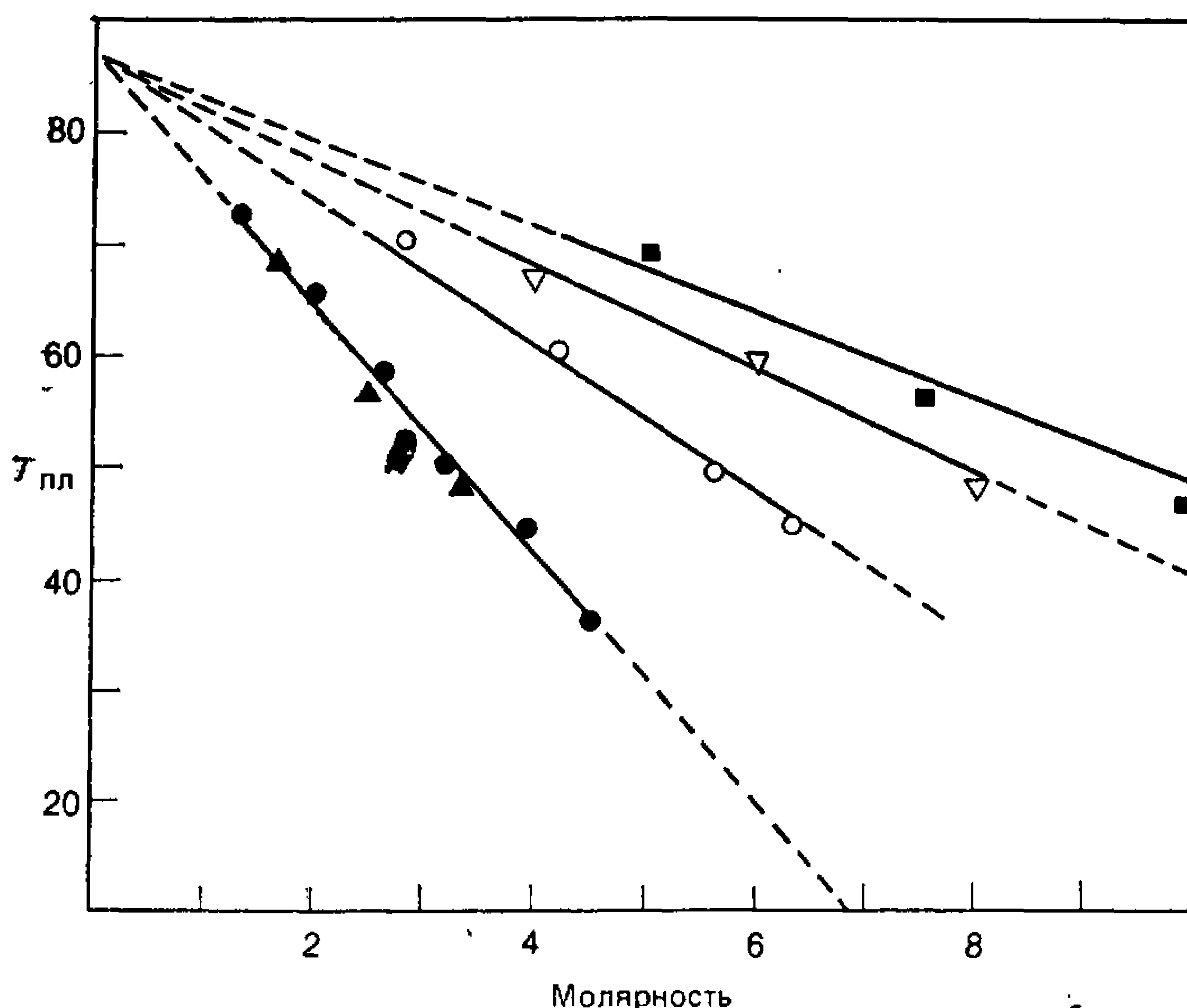


Рис. 4.5. Зависимость прочности комплексов амфолин—краситель от содержания диссоциирующих добавок. Кривые плавления снимали на регистрирующем спектрофотометре Gilford Model 2400 в режиме контролируемого повышения температуры на 1,0 °С за 1 мин при длине волны 585 нм. К растворам с постепенно нарастающей концентрацией каждого из пяти исследуемых диссоциирующих агентов добавляли краситель Benzo New Blue 5BS (30 мкг/мл). $T_{пл}$ комплекса амфолины—краситель, полученная путем экстраполяции к нулевой концентрации диссоциирующих добавок, равна 87 °С. ● — диметилформамид, ■ — формамид, ○ — диметилсульфоксид, ▽ — мочевина, ▲ — тетраметилмочевина. Наиболее эффективными диссоциирующими агентами оказались диметилформамид и тетраметилмочевина. (Righetti et al., 1977.)

сульфоксид (ДМСО), 50%-ный диметилформамид (ДМФ), 50%-ная тетраметилмочевина (ТММ) и формамид (ФА) в концентрации до 90% (Righetti et al., 1977). При ИЭФ содержание любого из этих агентов, за исключением ФА, не должно превышать 50%, поскольку при более высоких концентрациях начинается преципитация амфолинов. В случае ИЭФ в ПААГ концентрация ДМФ и ТММ не должна превышать 30—35%, так как при более высоком содержании эти вещества препятствуют полимеризации геля. Для диссоциации комплексов типа амфолины—краситель наиболее эффективны ДМФ и ТММ, а наименее эффективным агентом оказывается ФА (при одинаковых молярных соотношениях; см. рис. 4.5). Тем не менее ФА можно было бы считать весьма полезным дезагрегирующим компонентом, поскольку при концентрации до 95% он не препятствует полимеризации геля и не вызывает преципитации амфолинов. К сожалению, ФА подвержен быстрому гидролизу у катода с образованием свободных аммиака и муравьиной кислоты, которые препятствуют нормальному формированию градиента pH и фокусированию образцов.

4.3. Внесение образца

Ранее мы подробно останавливались на способах внесения образца в случае ИЭФ в циллиндрических (разд. 3.2.10) и плоских (разд. 3.2.14) гелях и вкратце — в случае ИЭФ в вертикальной колонке со стабилизацией градиентом сахарозы (разд. 2.1.1). В настоящем разделе будут дополнительно рассмотрены некоторые методические аспекты внесения образца для последнего варианта. Образец можно вносить в колонку как до, так и после образования градиента pH. В первом варианте перед началом ИЭФ можно равномерно распределить образец по всему объему колонки или внести в виде достаточно узкой зоны в предполагаемую область его фокусирования. Часто отдают предпочтение последнему методу, поскольку он позволяет сократить время фокусирования и избежать нежелательного контакта образца с анолитом и католитом. Внесение образца при этом осуществляется следующим образом: в колонку наслаивают рабочий градиент плотности до того уровня, на котором ожидается фокусирование образца, далее следующие порции градиентного раствора последовательно заливают в три пробирки (см. рис. 4.6): 0,5 мл (в 1-ю пробирку), 3 мл (во 2-ю пробирку) и 0,5 мл (в 3-ю пробирку) для колонки объемом 110 мл или 1,0, 10,0 и 1,0 мл в 1, 2 и 3-ю пробирки соответственно для колонки объемом 440 мл. К раствору во 2-й пробирке добавляют образец, осторожно перемешивают, а затем растворяют дополнительно несколько кристалликов сахарозы, с тем чтобы плотность

раствора оказалась выше, чем в 3-й, но ниже, чем в 1-й пробирке. В том случае, если плотность подобрана правильно, капля раствора из 1-й пробирки должна опускаться на дно, а из 3-й — всплывать к поверхности раствора во 2-й пробирке. После этого содержимое 2-й пробирки вносят в колонку и продолжают наслаивание градиента (рис. 4.6).

Однако часто оказывается более предпочтительным вносить образец в уже сформированный градиент pH, с тем чтобы уменьшить время контакта с амфолинами, например в случае ИЭФ металлозависимых ферментов или компонентов, подверженных дестабилизации или инактивации в изоточке, в частности при ИЭФ целых клеток. С этой целью в работе Sherbet, Lakshmi, 1973, была предложена модификация колонки фирмы LKB 8100-1 с использованием впаянного в середину колонки специального бокового отвода с перегородкой. После префокусирования образец через этот отвод вносят в середину градиен-

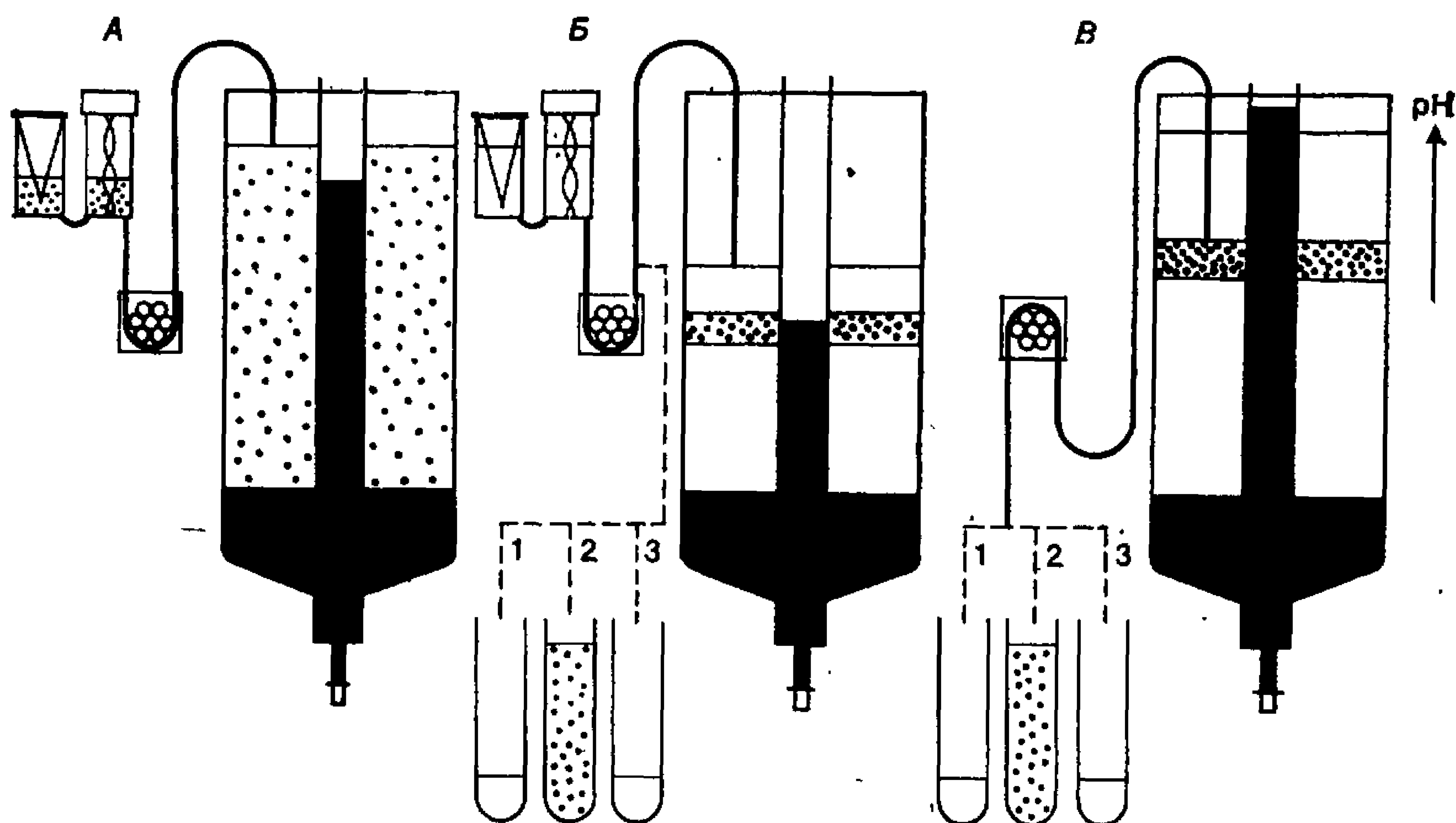


Рис. 4.6. Внесение образца в колонку для препаративного ИЭФ. *А*. Образец равномерно распределен по всему объему градиента. *Б*. Образец внесен в виде узкой зоны вблизи предполагаемой области его фокусирования в процессе наслаивания градиента плотности. Для этого после заполнения колонки до определенного уровня рабочий раствор от смесителя подают последовательно в три пробирки (0,5, 3 и 0,5 мл в случае колонки объемом 110 мл и 1,0, 10 и 1,0 мл — для колонки объемом 440 мл; пробирки 1, 2 и 3 соответственно). Образец растворяют в центральной пробирке, плотность полученного раствора корректируют так, как это описано в тексте. Затем раствор образца переносят в колонку и поверх него наслаивают остаток градиента плотности. *В*. Внесение образца в сформированный градиент pH. В этом случае три пробирки заполняют (так же, как в случае *Б*) раствором, который откачивают с определенного участка градиента в колонке. Образец растворяют в центральной пробирке, корректируют плотность раствора и закачивают его обратно в колонку. (С любезного разрешения LKB Produkter AB.)

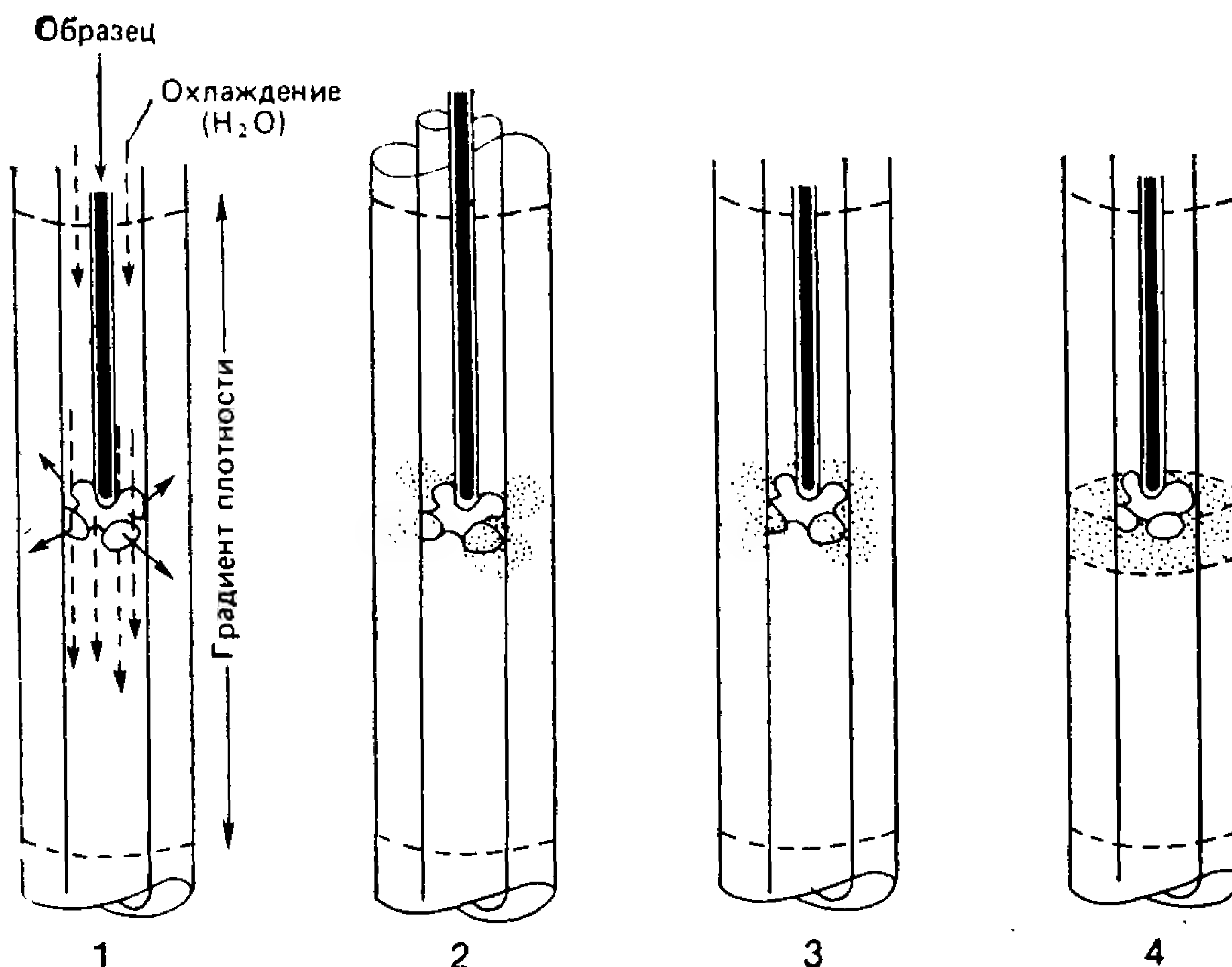


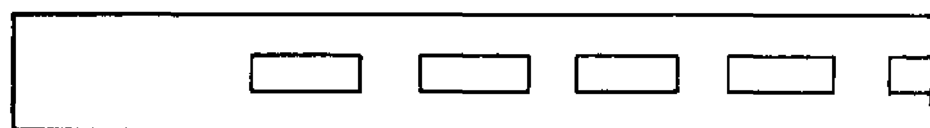
Рис. 4.7. Система внесення образца для ИЭФ клеток. Рубашка внутреннего охлаждеиия изготовлена в виде «пальца», верхняя половина которого состоит из двух концентрических цилиндров. Суспензию клеток подают во внутреннюю цилиндрическую трубку, нижний конец которой через четыре отвода соединяется с наружной поверхностью «пальца». Меняя глубину погружения «пальца» в колонку, суспензию клеток можно вносить в заранее выбранную область градиента. (Boltz et al., 1978.)

та, после чего его разделение занимает всего лишь 2—3 ч (см. также гл. 5). Для внесения образца в самодельную колонку, описанную в работе Boltz et al., 1978, использовалась специальная трубка в рубашке внутреннего охлаждения (рис. 4.7). Суспензию клеток подавали в колонку через четыре отверстия в стенке рубашки, с которыми соединяется вышеупомянутая трубка. Участок градиента, на который вносится образец, можно выбирать, изменяя глубину погружения рубашки охлаждения, изготовленной в виде «пальца» со свободой перемещения по вертикали. Можно пользоваться и более простым методом — после образования градиента pH через отверстие вверху колонки вводят тонкую трубочку до того уровня, на который желательно нанести образец, через неё откачивают 4 или 12 мл рабочего раствора (для колонок объемом 110 или 440 мл соответственно); этот раствор разливают по трем пробиркам и в одну из них добавляют образец так же, как это было описано выше. После соответствующей подгонки и проверки плотности раствора образца его закачивают обратно в колонку через ту же трубочку

(рис. 4.6). Затем трубочку вынимают и проводят фокусирование образца.

Говоря о фокусировании в плоских гелях, помимо методов внесения образца, рассмотренных в гл. 3 (см. рис. 3.20), следует упомянуть о наиболее эффективном на сегодняшний день способе, основанном на применении накладок из силиконовой резины или полиэфирной пленки, в которых прорезаны круглые или прямоугольные отверстия (рис. 4.8). Преимущество этого способа по сравнению с тем, при котором используются кусочки фильтровальной бумаги, смоченные раствором образца, заключается в том, что не происходит потери белков за счет адсорбции на бумаге. Использование накладок не искажает равномерного распределения электропроводности, как при внесении образцов в заранее сформированные лунки в геле. Накладки для нанесения образцов обычно помещают недалеко от одного из электродов, на расстоянии, составляющем 10—20% от расстояния между электродами, и обязательно на таком участке геля, который не пересекается с областью фокусирования образцов. Накладки можно использовать многократно, промывая их после употребления 1 N щелочью и споласкивая водой.

В опубликованной недавно работе Cantreel et al., 1981, сообщалось, что при ИЭФ в цилиндрических гелях внесение образца со стороны катода (в виде тонкого слоя раствора с повышенной плотностью) вызывает искажение градиента pH. В частности, в зависимости от содержания белка протяженность градиента может сократиться на 1 ед. pH. Было предложенно несколько объяснений тому, каким образом количество внесенного белка может сказаться на искажении щелочной области градиента pH, однако ни одно из них не кажется мне убедительным. Авторы, судя по всему, упустили из виду наиболее вероятное объяснение. Дело в том, что образцы содержали



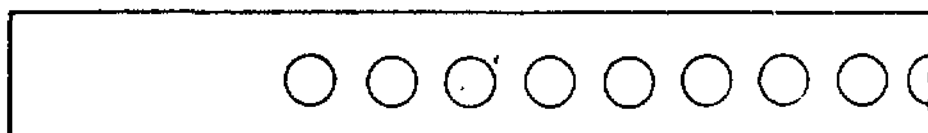


Рис. 4.8. Полоски с прямоугольными илн круглыми лунками для нанесения образцов на поверхность геля при ИЭФ, изготовленные из силиконовой резины. (С любезного разрешения фирмы Desaga.)

5%-ный меркаптоэтанол (что соответствует концентрации примерно 0,5 *М*), р*К* которого находится в районе 9,5. Вполне возможно, что меркаптоэтанол в такой концентрации перекрывает буферную емкость амфолитов-носителей (концентрация которых в среднем едва достигает 20 м*М*) и понижает pH в катодной части геля до значений, близких к его р*К*. Что касается меня, то при ИЭФ образцов, содержащих меркаптоэтанол, я предпочитаю проявлять осторожность и вносить образцы в гель со стороны анода. При этом мне ни разу не доводилось сталкиваться с какими-либо искажениями формы градиента pH или изменениями его протяженности.

4.4. Выбор градиента pH. Получение узких градиентов pH

Из уравнений, описывающих процесс ИЭФ (Svensson, 1962a), ясно, что хорошей разрешающей способности можно добиться при фракционировании компонентов, характеризующихся низкими коэффициентами диффузии и сильной зависимостью подвижности от pH вблизи изоточки. Хорошему разрешению способствуют также высокая напряженность поля (В/см) и использование пологого градиента pH. Последнее на практике реализуется с помощью наборов амфолитов узких диапазонов pH, способных обеспечить рабочий градиент pH протяженностью 1,5—2 ед. pH на всем пути разделения. Для достижения еще более высокого разрешения используют и более узкие градиенты pH. В частности, как уже упоминалось, выпускаются готовые пластинки для разделения фенотипических вариантов α_1-антитрипсина в диапазоне pH 4—5. Смеси амфолитов, купленные или полученные самостоятельно в лаборатории, можно подвергнуть более тонкому изоэлектрическому фракционированию (Righetti, Drysdale, 1971; Gianazza et al., 1975) для получения наборов с рабочим диапазоном 0,4—0,5 ед. pH. Как было показано в работе Charlionet et al., 1979, при ИЭФ в таких диапазонах можно разделить белки, pI которых различаются всего лишь на 0,001 ед. pH. Другой способ модификации формы градиента pH основан на технике «разделительного ИЭФ», описанной в работах Caspers et al., 1977, и Brown et al., 1977. Добавляя к обычному амфолиновому градиенту pH дополнительные амфотерные компоненты («разделители» или «модификаторы градиента pH»; Beccaria et al., 1978), удается изменить форму градиента, как правило, с образованием пологих участков в области pI добавленного компонента. В качестве «модификаторов градиента pH» использовались следующие вещества: тетраглицин (pI 5,2), пролин (pI 6,3), β-аланин (pI 6,9), 5-аминовалериановая кислота (pI 7,5), 4-аминомасляная кислота, 7-аминокапри-

ловая кислота, гистидин (pI 7,6) и 6-аминокапроновая кислота (pI 8,0). Все они, за исключением гистидина, являются «плохими» амфолитами-носителями (значение pI—p*K* около 3—4) и поэтому в амфолиновом градиенте pH фокусируются в виде широких плато. Для существенного изменения формы градиента pH концентрация этих соединений должна быть достаточно высока — обычно порядка 0,3—0,6 *M*. В то же время в случае хороших амфолитов типа His (или дипептида His-Gly, который был успешно использован для разделения HbA и его минорной гликозилированной формы HbA_{1c}, см Beccaria et al., 1978) эти вещества оказываются эффективными уже в концентрации 10—50 мМ. Их действие, возможно, заключается в разделении двух компонентов за счет встраивания на участке градиента pH между ними. Модификация градиента pH открывает перед ИЭФ совершенно новые возможности и позволяет повысить разрешающую способность метода до теоретически допустимого предела. Об успешном разделении HbA и гликозилированного HbA_{1c} с использованием β-аланина в качестве модификатора градиента для серийных анализов на диабет сообщалось также в работе Jeppson et al., 1980. В некоторых случаях для улучшения разрешения на отдельных участках градиента pH используют смеси нескольких модификаторов. Так, в работе Cossu et al., 1982, разделение HbA, HbF и HbF_{ac} из крови пупочного канатика для определения талассемии у новорожденных проводилось с помощью ИЭФ в присутствии эквимолярных количеств β-аланина и 6-аминокапроновой кислоты. Недавно было описано проведение «разделительного ИЭФ» в сочетании с использованием агарозной матрицы (Qureshi, Punnett, 1981). Авторы разделяли изоформы α_1-антитрипсина в агарозном геле, содержащем дополнительно N-(2-ацетамид)-2-аминоэтансульфоновую кислоту.

Еще один вариант получения пологих градиентов pH, так называемый метод «наложения полосок» («strip technique»), был описан недавно в работе Altland, Kaempfer, 1980. Этот метод основан на представлении о том, что изменение профиля (толщины) геля вдоль градиента pH должно сопровождаться изменением формы этого градиента. Соответствующее локальное изменение толщины геля проще всего достичь с помощью наложения на него дополнительной полоски геля определенной толщины и ширины на каком-либо участке градиента. В электрическом поле амфолиты данного диапазона pI переходят из наложенной полоски в свободную область основного геля, а другие амфолиты, напротив, частично удаляются из основного геля, что приводит к образованию более пологого градиента pH в геле. Примеры, иллюстрирующие применение этого метода, приведены на рис. 4.9 для случая фокусирования в диапазоне pH 6—8.

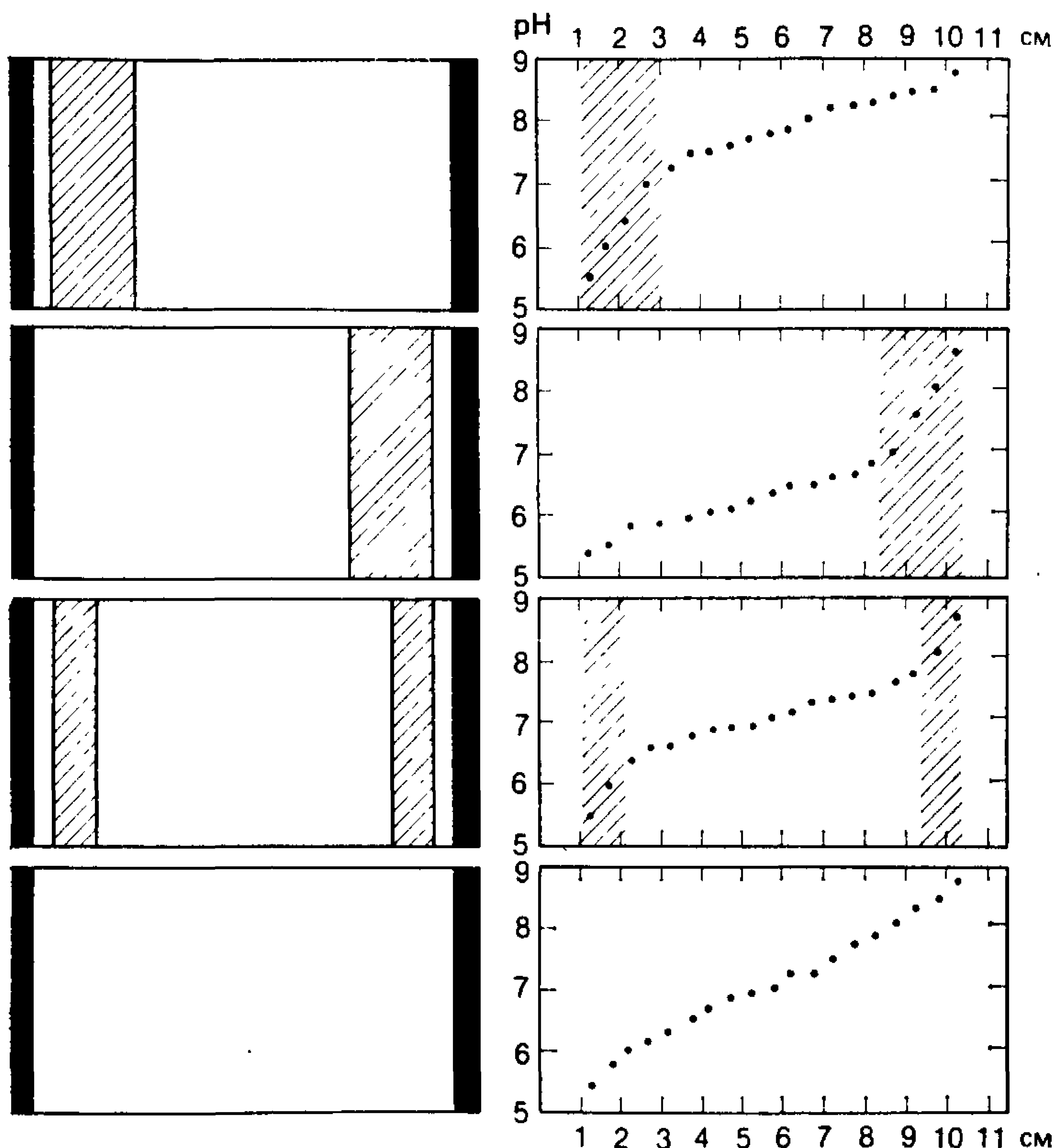


Рис. 4.9. Различные варианты модификации формы градиента pH при наложении полосок геля толщиной 2 мм на основной гель толщиной 350 мкм, содержащий 2%-ные сервалиты с диапазоном pH 6—8. Расположение полосок отмечено штриховкой. Условия фокусирования: 16 °С, 4 ч, 7,5 мА (стабилизация по току), напряжение не выше 1000 В. (Altland, Kaempfer, 1980.)

при различных вариантах расположения дополнительных полосок геля. При наложении полоски вблизи анода в остальном геле образуется пологий градиент pH 7,2—8, при наложении полоски у катода — пологий градиент 6,0—7,0, а при симметричном расположении двух полосок у обоих электродов удается сделать более пологой центральную область градиента pH 6,5—7,5. Иллюстрацией практического применения такого подхода служит фотография на рис. 4.10, демонстрирующая постепенное улучшение разрешения зон гемоглобинов HbA_2, HbA и HbF при ИЭФ в пластине геля, на которую с обеих сторон наложены постепенно расширяющиеся дополнительные полоски геля. Для получения хороших результатов объем дополнительной полоски должен быть не меньше полного объема основного геля,

в то же время по ширине такая полоска не должна составлять более 20—25% от расстояния между электродами. С этой точки зрения предпочтительно пользоваться ультратонкими основными гелями (200—300 мкм), с тем чтобы толщина дополнительных полосок могла составлять около 1,5—2 мм. Интересно было бы проверить, может ли совместное использование этого метода и метода «разделительного ИЭФ» привести к получению еще более пологих градиентов pH и, таким образом, к дальнейшему повышению разрешающей способности ИЭФ.

Рассмотренный выше метод (Altland, Kaempfer, 1980) был независимо «открыт» и описан в работе других авторов (Laas, Olsson, 1981), которые назвали его «методом ИЭФ в градиенте pH с переменной толщиной геля». Эти же авторы предложили и другую разновидность метода — «фокусирование в градиенте pH с переменной концентрацией» (амфолитов). Сущность обоих методов проиллюстрирована на рис. 4.11,*А*,*Б*. Следует отметить, что последний метод не очень удобен в исполнении, поскольку требует раздельной полимеризации нескольких секций геля, содержащих различные количества амфолитов. Сходство обоих методов заключается в том, что в результате неоднородности

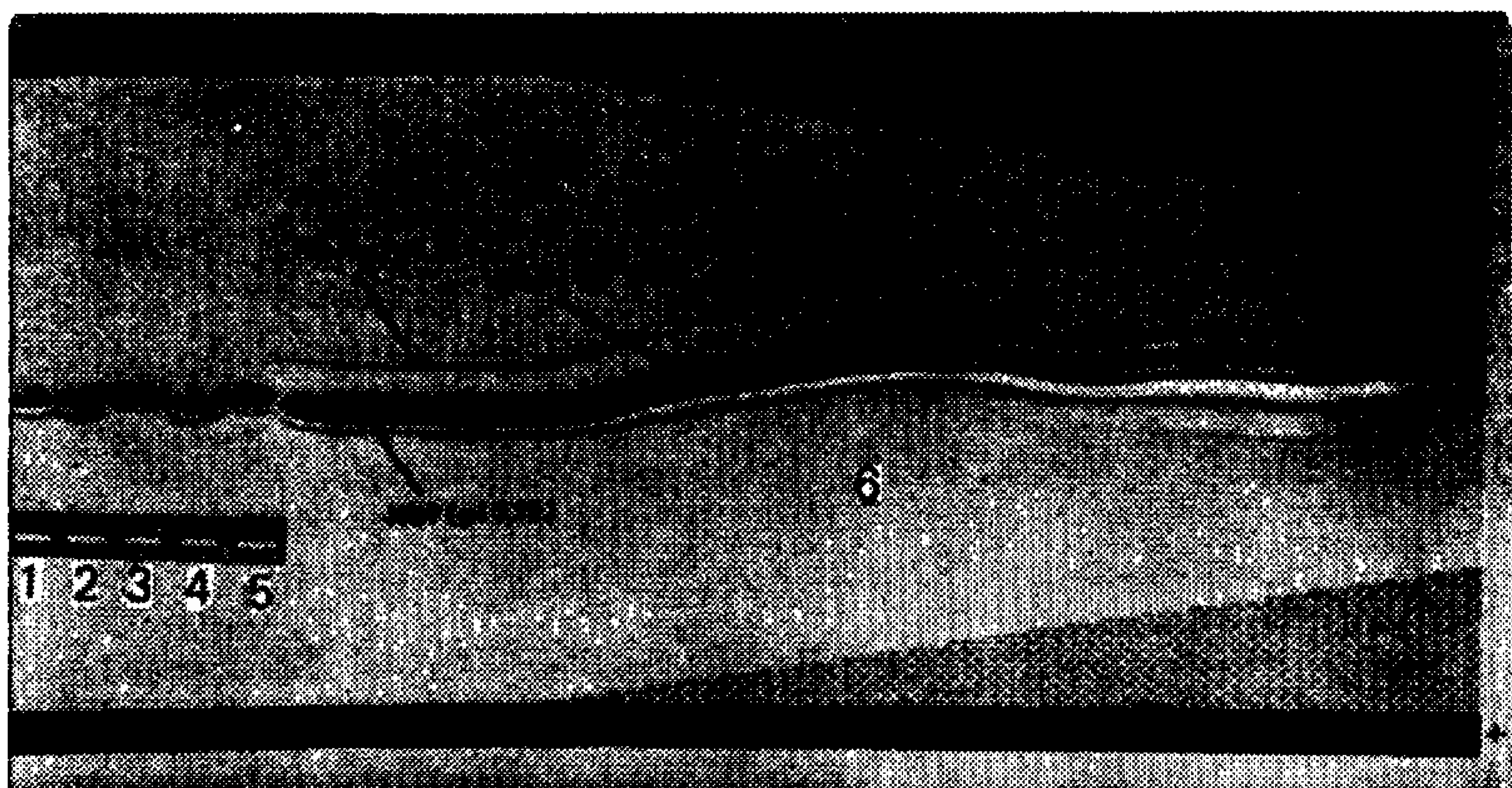


Рис. 4.10. Постепенное уменьшение крутизны градиента pH, приводящее к повышению разрешающей способности при ИЭФ гемоглобинов. Основной гель толщиной 350 мкм содержит 2%-ные сервалиты pH 6—8. Клиновидные полоски геля толщиной 2 мм с шириной у основания 2 см (с правого края) покрывают участки основного геля, показанные штриховкой, в продолжение всего опыта. Образцы (*слева направо*): 1, 2 и 4 — по 15 мкл лизата эритроцитов взрослого человека; 5 — аналогичный препарат из эритроцитов новорожденного; 3 — смесь равных количеств препаратов 1 и 5; 6 (длинная полоса) — смесь препаратов 1 и 5 в соотношении 3:1. Условия опыта: температура 16 °С, префокусирование 30 мин, постоянный ток 7,5 мА, предельное напряжение 1000 В; фокусирование образцов — 5 ч, постоянное напряжение 1000 В. (Altland, Kaempfer, 1980.)

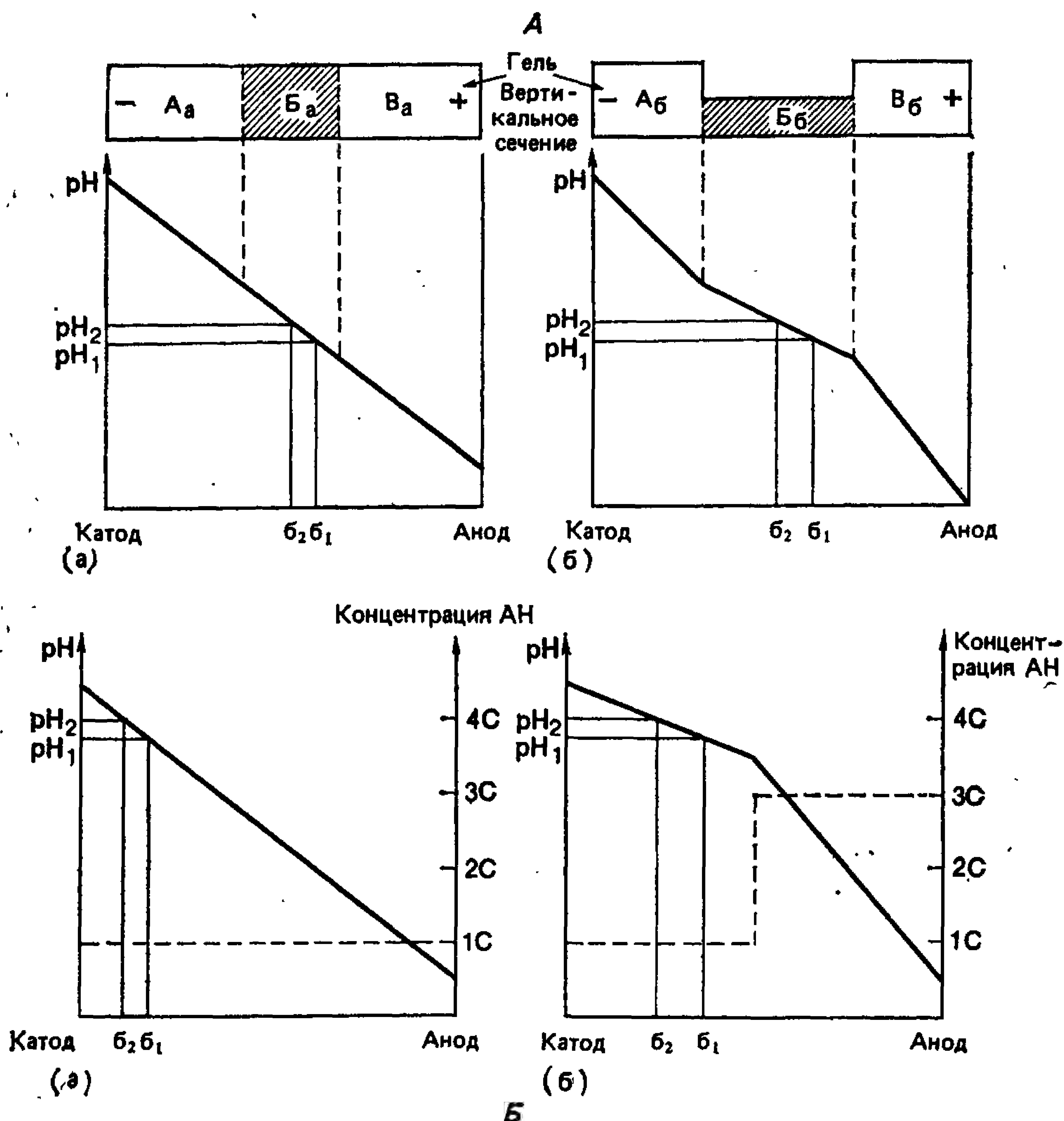


Рис. 4.11. *А*. Схема, иллюстрирующая принцип фокусирования в градиенте pH с переменной толщиной геля. (а) — обычное ИЭФ в геле с постоянной толщиной; (б) — ожидаемое изменение формы градиента pH при уменьшении толщины слоя в центральной части геля. Заштрихованные участки в обоих случаях составляют одну и ту же часть от общего объема каждого из гелей и содержат один и тот же набор амфолитов-носителей. Отмечены ожидаемые зоны фокусироваиия двух гипотетических белков $б_1$ и $б_2$ со значениями изоточек pH_1 и pH_2 соответственно. *Б*. Схема, иллюстрирующая принцип фокусирования в градиенте pH с переменной концентрацией амфолитов. (а) — обычный градиент pH, образующийся при равномерном концентрационном распределении амфолитов по всему рабочему объему; (б) — ожидаемая форма градиента pH для случая, когда в левой половине геля концентрация амфолитов-носителей втрое выше, чем в правой. Отмечены положения гипотетических белков $б_1$ и $б_2$ с изоточками pH_1 и pH_2 соответственно. АН — амфолиты-носители. (Lååas, Olsson, 1981.)

геля в определенной зоне градиент напряженности поля оказывается значительно выше, чем в остальных участках геля, что приводит к резкому сужению белковых полос при миграции через эту зону. По-видимому, можно было бы скомбинировать все три методических подхода (ИЭФ в модифицированном градиенте рН, ИЭФ в градиенте рН с переменной толщиной геля и ИЭФ с переменной концентрацией амфолитов) и достичь еще более высокого разрешения, которое позволило бы решать еще более сложные аналитические задачи.

4.5. Измерение градиента рН

pI белка, определенное с помощью ИЭФ, соответствует его изоионной точке в отсутствие комплексо-образующих ионов. По определению изоионная точка — это мера собственной кислотности чистого белка, поскольку ее значение определяется как такое значение рН раствора, которое остается неизменным после добавления к нему небольшого количества чистого белка (Sorensen et al., 1926). Это определение подходит и в случае ИЭФ белка, поскольку положение (и рН) сфокусированной зоны, как известно, не изменяется при увеличении содержания белка в зоне. Значения pI, определяемые с помощью ИЭФ, зависят от температуры и с ее увеличением, как правило, уменьшаются (Vesterberg, Svensson, 1966). Разность между значениями pI одного и того же белка, измеренными при 25 и 4 °С, может достигать 0,5 ед. рН. Понижение температуры ниже 4 °С сопровождается дальнейшим повышением наблюдаемого pI белка. Это различие проявляется наиболее отчетливо для щелочных белков,

Таблица 4.1. Значения рK и ΔH_i^0, использованные для расчета температурного сдвига pI у модельных белков (Fredriksson, 1977)

Ионизируемая группа	рK (25 °С)	ΔH_i^0, ккал/моль	рK (4 °С)[1]	ΔрK
Карбоксильная	4,50	1	4,56	0,06
Имидазольная	6,50	7	6,89	0,39
α-Амино-	7,80	10	8,36	0,56
Фенольная	9,80	6	10,13	0,33
ε-Амино-	10,00	12	10,67	0,67

[1] Рассчитано по уравнению Вант-Гоффа исходя из известных значений ΔH_i^0. ΔH_i^0 — стандартная теплота ионизации.

а также для белков, значения pI которых близки к pK каких-либо их функциональных групп. В самом деле, все протолитические группы белков, за исключением карбоксильных групп, характеризуются довольно большой стандартной теплотой ионизации (ΔH_i^0 лежит в диапазоне 6—14 ккал/моль; см. табл. 4.1). Поэтому изменение значений pK в температурном интервале 4—25 °С будет очень мало для карбоксилов (ΔpK=0,06), достаточно велико для имидазольных групп (ΔpK=0,39) и очень велико для ε-аминогрупп лизина (ΔpK=0,67) (Tanford, 1962; Bull, 1971). Таким образом, можно полагать, что у нейтральных и щелочных белков величина dpI/dT будет достаточно высока. Экспериментально было показано, что кривые зависимости ΔpH и ΔpI от pI (см. рис. 4.12) для амфолитов-носителей и белков соответственно идут параллельно только в диапазоне pH ниже 5 и заметно расходятся в области pH 5—9, главным образом благодаря вкладу функциональных групп His и Lys в белках (Fredriksson, 1977). Как видно из рис. 4.12, соответствующие кривые пересекаются в области pH 7,4. Именно это обстоятельство позволило утверждать, что значения pI для миоглобина лошади, определенные при 4 и 25 °С, совпадают (Vesterberg, Svensson, 1966). В то же время для большинства белков это,

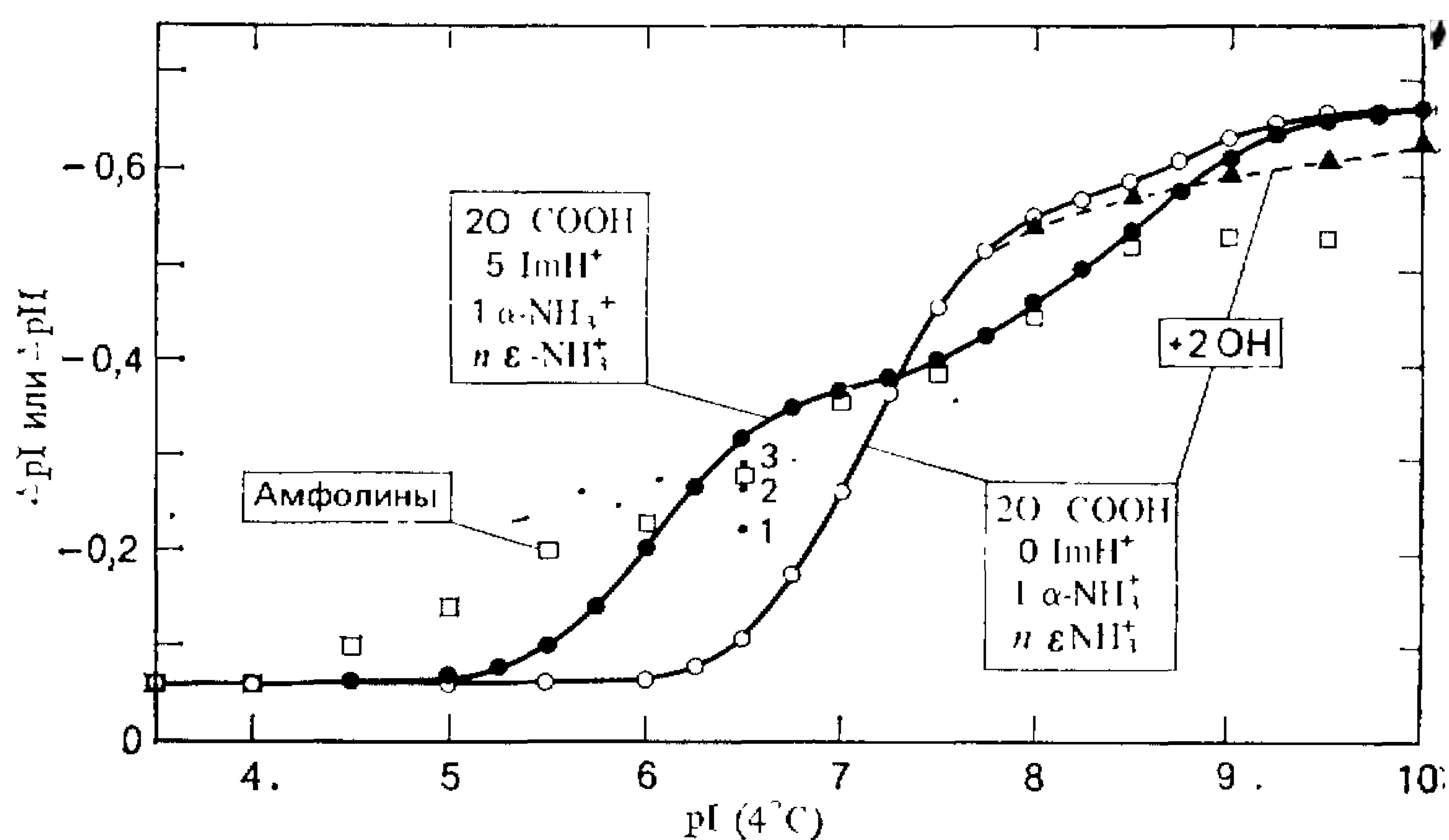


Рис. 4.12. Разность значений pI (ΔpI) при двух температурах, 25 и 4 °С, для некоторых модельных белков в зависимости от pI при 4 °С. В рамках указано гипотетическое содержание протолитических групп в двух модельных белках. Число ε-аминогрупп (n) в каждом случае заранее не уточняется, а подбирается таким образом, чтобы модельный белок характеризовался заданным значением pI (4,0; 4,5 и т. д.) при 4 °С. При этом в общем случае n оказывается нецелым числом. Точки 1—3 соответствуют модельным белкам с pI=6,5 при 4 °С, содержащим 1, 2 и 3 имидазольные группы соответственно. Кроме того, на рисунке приведены точки, отвечающие смещению pH (ΔpH), которым сопровождается нагревание изоэлектрических (при 4°С) фракций амфолитов от 4 до 25°С (рассчитано на основании данных Davies, 1970). (Fredriksson, 1977.)

конечно, не так. Как правило, следует ожидать, что значения pI, определенные при 4 °С, окажутся выше, чем при 25 °С. Для сильнокислых белков значение dpI/dT вблизи 4 °С в среднем должно составлять около −0,005 (ед. pH на градус), а для сильнощелочных — около −0,03. В работе Fredriksson, 1978, были приведены таблицы, позволяющие перевести значения pI, полученные в результате фокусирования при 4 °С и измерения pH при 25 °С, в истинные значения pI при 4 °С. Эти таблицы составлены на основе экспериментальных данных по температурному смещению pI для определенных фракций амфолинов, сфокусированных в сахарозном градиенте плотности, при изменении температуры от 4 до 25 °С.

Располагая хорошим набором маркеров с известными значениями pI при 4 и 25 °С, можно обойтись без трудоемкой процедуры измерения pH после ИЭФ. В ряде работ опубликованы таблицы, иллюстрирующие возможности применения различных белков и красителей в качестве pH-маркеров при ИЭФ (Bours, 1973d; Radola, 1973a; Righetti, Caravaggio, 1976; Conway-Jacobs, Lewin, 1971; Nakhleh et al., 1972). Во избежание неоднозначности в идентификации зон белковые маркеры должны быть гомогенны или по крайней мере содержать один преобладающий легко идентифицируемый компонент. Весьма привлекательным представляется использование в качестве маркеров красителей, но, к сожалению, многие из них, особенно сульфопроизводные, активно взаимодействуют с амфолитами-носителями. Это проявляется в образовании множественных зон, отвечающих различным комплексам краситель—амфолит (Righetti et al., 1977). Перечень некоторых pH-маркеров приведен в табл. 4.2. В настоящее время подобные наборы маркеров поставляются многими фирмами (Pharmacia, BDH и др.).

Для измерения pH после ИЭФ в градиенте плотности в ряде работ были предложены различные конструкции проточной кюветы для непрерывной регистрации pH в элюате (Jonsson et al., 1969; Secchi, 1973; Strongin et al., 1973). Профиль pH может записываться на той же ленте, что и профиль УФ-поглощения; это облегчает процесс идентификации пиков. В работах Gelsema, De Ligny, 1977, и Gelsema et al., 1977, 1978, подчеркивалось, что при использовании различных добавок (особенно при ИЭФ в градиенте плотности) следует ввести ряд поправок, корректирующих определяемое кажущееся значение $pI_{каж}$. Основные положения, выдвинутые авторами, можно кратко сформулировать следующим образом:

а. Отклонение от истинного значения ($pI_{каж}$—pI) при традиционном ИЭФ в градиенте плотности зависит от кислотности, основности и химического типа амфолита, а также от состава растворителя.

Таблица 4.2а. pH-маркеры для изоэлектрофокусирования

Белки	pI при 25 °C	Литературный источник	pI при 25 °C	Литературный источник	pI при 4 °C	Литературный источник
Цитохром *C*	9,28±0,02	Radola, 1973a				
Рибонуклеаза	8,88±0,03	Radola, 1973a				
Миоглобин кашалота						
основной компонент	8,18±0,02	Radola, 1973a	8,18±0,04	Nakhleh et al., 1972		
минорный компонент	7,68±0,02	Radola, 1973a				
Миоглобин лошади						
основной компонент	7,33±0,01	Radola, 1973a	7,45±0,04	Nakhleh et al., 1972	7,58±0,02	Bours, 1973d
минорный компонент	6,88±0,02	Radola, 1973a	7,15	Nakhleh et al., 1972	2,22±0,05	Bours, 1973d
Бычий гемоглобин A	6,80	Conway-Jacobs, Lewin, 1971				
Бычья карбоангидраза					6,18±0,02	Bours, 1973d
Кональбумин	5,88±0,02	Radola, 1973a			5,45±0,02	Bours, 1973d
β-Лактоглобулин B	5,31	Radola, 1973a			5,35	Bours, 1973d
β-Лактоглобулин A	5,14±0,01	Radola, 1973a				
Бычий инсулин	5,32±0,02	Conway-Jacobs, Lewin, 1971				
Бычий альбумин (фракция V Кона)	4,90	Conway-Jacobs, Lewin, 1971			4,95±0,02	Bours, 1973d
Овальбумин	4,70	Conway-Jacobs, Lewin, 1971				
Ферритин I из селезенки лошади	4,50±0,02	Radola, 1973a				
Ферритин II из селезенки лошади	4,38±0,02	Radola, 1973a				
Ферритин III из селезенки лошади	4,23±0,03	Radola, 1973a				

Таблица 4.26. pH-маркеры для изоэлектрофокусирования

Красители	pI при 25 °C	Литература
Трис(5-OH)—железо(II)[1]	7,15	Nakhleh et al., 1972
Бис(5-OH)-4-OH—железо(II)[2]	6,82	Nakhleh et al., 1972
Бис(4-OH)-5-OH—железо(II)[3]	6,24	Nakhleh et al., 1972
Конго красный	5,80	Conway-Jacobs, Lewin, 1971
Трис(4-OH)—железо(II)[4]	5,45	Nakhleh et al., 1972
Голубой Эванса	5,35	Conway-Jacobs, Lewin, 1971
Метиловый голубой	3,60	Conway-Jacobs, Lewin, 1971
Быстрый зеленый FCF (основной компонент)	3,05	Conway-Jacobs, Lewin, 1971
Патентованный голубой V	3,00	Conway-Jacobs, Lewin, 1971

[1]) Трис(5-гидрокси-1,10-фенантролин)—железо(II).

[2]) Смешанный комплекс между трис(5-гидрокси-1,10-фенантролин)—железом(II) и трис-(4-гидрокси-1,10-фенантролин)—железом(II).

[3]) Смешанный комплекс между трис(4-гидрокси-1,10-фенантролин)—железом(II) и трис-(5-гидрокси-1,10-фенантролин)—железом(II).

[4]) Трис(4-гидрокси-1,10-фенантролин)—железо(II).

б. В среднем величина отклонения для амфолинов (и, вероятно, для белков) в диапазоне 3<pI<9 при ИЭФ в градиенте концентрации сахарозы 0—60% не превышает ±0,1 ед. pH.

в. Коэффициенты температурной зависимости для pI амфолинов (и, вероятно, белков) хорошо коррелируют с относительным содержанием карбоксильных и аминогрупп.

г. Влияние среды на pI амфолинов, отражаемое зависимостью pI*—pI от концентрации сахарозы, глицерина или этиленгликоля, хорошо согласуется с влиянием тех же параметров на величину p*K**—p*K* в случае карбоновых кислот и алкилзамещенных аминов.

д. Значения $pI_{каж}$—pI, определенные для амфолинов, можно использовать в качестве поправки для соответствующих значений $pI_{каж}$ белков, определяемых с помощью ИЭФ в градиенте плотности.

Для коррекции значений pI, полученных при ИЭФ в градиенте плотности, содержащем 6*М* мочевину, в работе Ui, 1971, предлагается вычитать из соответствующих значений величину 0,42 ед. pH. В работе Josephson et al., 1971, в качестве поправок при ИЭФ в 7*М* мочевине рекомендуются величины 0,7—0,9 ед. pH. Другие авторы (Gianazza et al., 1977) показали, что влияние мочевины при ИЭФ зависит от конкретного рабочего диапазона pH и может быть количественно выражено величиной, изменяющейся от 0,05 до 0,075 ед. pH на 1 ед. молярности мочевины при переходе от кислых амфолинов к щелочным. Эти

данные согласуются и с выводами, сделанными в работе Gelsema, DeLegny, 1977, о некорректности использования одной и той же поправки для наблюдаемых значений pI независимо от конкретной области pH фокусирования.

Для измерения pH в цилиндрических гелях было принято разрезать гель на сегменты длиной 2—5 мм и элюировать из них амфолиты в 200—300 мкл 10 мМ KCl. Недавно эту операцию удалось заменить автоматическим pH-сканированием при помощи контактного микроэлектрода (типа Ingold № E 547310-1), смонтированного на механическом приводе, который перемещает электрод вдоль поверхности цилиндрического геля, помещенного в специальный желобок в пластиковом блоке (Chidakel et al., 1977). Сканирование геля проводится со скоростью 1 см/1,5 мин; значение pH автоматически регистрируется на ленте самописца. В пластинах геля pH можно измерить непосредственно на поверхности с помощью электрода с плоской мембраной типа LOT 403-30-M8 фирмы Ingold (диаметр мембраны 6 мм). При этом точки, в которых фиксируются значения pH, можно пометить, проделав в геле отверстия диаметром 1—2 мм (Righetti, Caravaggio, 1976). Первоначально для этих целей были предложены сурьмяные электроды (Beeley et al., 1972), которые в настоящее время практически не используются ввиду плохой воспроизводимости и отклонения от «нернстовых» свойств. Недавно было описано применение иридиевого микроэлектрода (Papeschi et al., 1976; Gianazza et al., 1977), изготовленного в виде иглы с кончиком толщиной 0,2—0,5 мм. Этот микроэлектрод является истинным «нернстовым» электродом с линейной зависимостью потенциала от pH и температуры. Это, по-видимому, единственный микроэлектрод, пригодный для измерения pH при 4 °C, т. е. при обычной температуре ИЭФ (при использовании других микроэлектродов перед измерением pH гель приходится нагревать до комнатной температуры).

В заключение остановимся на специфических проблемах, возникающих при сопоставлении значений pI, полученных при ИЭФ в градиенте плотности и в геле. Давно известно, что для целого ряда щелочных белков, в частности цитохрома *c* (Radola, 1973a; Bobb, 1973), химотрипсиногена (Salaman, Williamson, 1971), рибонуклеазы (Delincée, Radola, 1975) и субтилизина (Wadstrom, Smyth, 1975), значения pI, полученные с помощью ИЭФ в плоском геле, оказываются значительно ниже (на 1—2 ед. pH), чем соответствующие значения, полученные при ИЭФ в градиенте плотности. Было установлено, что это различие вызвано связыванием CO_2 из воздуха открытой поверхностью плоского геля (Delincée, Radola, 1978). Влияние CO_2 особенно велико в области pH выше 8,2—8,3. При тонкослойном ИЭФ в атмосфере, свободной от CO_2, и последующем измерении pH

(также в отсутствие CO_2) оказывается, что наблюдаемые значения pI щелочных белков прекрасно согласуются с данными ИЭФ в градиенте плотности.

4.6. Удаление амфолитов-носителей после ИЭФ

После ИЭФ часто возникает необходимость отделить белковые фракции от амфолитов-носителей. Поскольку у большинства амфолитов значения M_r лежат в диапазоне 600—900 (Bianchi Bosisio et al., 1981), казалось бы, несложно решить эту задачу с помощью обычного диализа. Однако с использованием [^{14}C]-амфолинов было найдено, что для полного их удаления диализом требуется не менее 32 ч даже при диализе против 0,1 *M* фосфатного буфера pH 7, содержащего 0,5 *M* NaCl (Vesterberg, 1970). В работах Nilsson et al., 1970, и Li, Li, 1973, было показано, что амфолиты удается весьма эффективно отделить с помощью осаждения белков сульфатом аммония в диапазоне концентраций 60—100% (от насыщения). После центрифугирования белковый осадок трижды промывают тем же раствором $(NH_4)_2SO_4$. Судя по всему, все амфолиты растворимы вплоть до содержания соли, соответствующего 100%-ному насыщению, и, таким образом, могут быть удалены полностью. Хорошего отделения белков от амфолитов удавалось также достичь при помощи гель-фильтрации на сефадексе G-50 (fine) в колонке, уравновешенной 0,1 *M* фосфатным буфером, содержащим 0,5 *M* NaCl (Quast, Vesterberg, 1968). Можно использовать также и другие буферные растворы, такие, как 0,1 *M* аммонийбикарбонат или 0,1 *M* имидазолацетат с pH около 7. Преимущество аммонийбикарбонатного буфера заключается в том, что он летуч и может быть удален при лиофилизации. Независимо от конкретного метода разделения, очень важно проводить его при высокой ионной силе буферного раствора (0,1—0,5 *M* соль), с тем чтобы произошла диссоциация относительно непрочных комплексов, образующихся между белками и амфолитами за счет электростатических взаимодействий.

В работе Brown, Green, 1970, предложен альтернативный метод разделения белков и амфолитов-носителей на ионообменнике смешанного типа (Bio Rad AG 501-X8). Этот метод, видимо, можно считать наиболее совершенным, так как, по данным Baumann, Chrambach, 1975, полученным с использованием (^{14}C)-меченых амфолитов, после хроматографии на бифункциональной смоле остаточное содержание амфолитов не превышает 0,005 моля на 1 моль белка. Такое разделение можно с уверенностью назвать количественным.

Существуют также методы электрофоретического удаления амфолинов, использованные, в частности, в работах Suzuki et

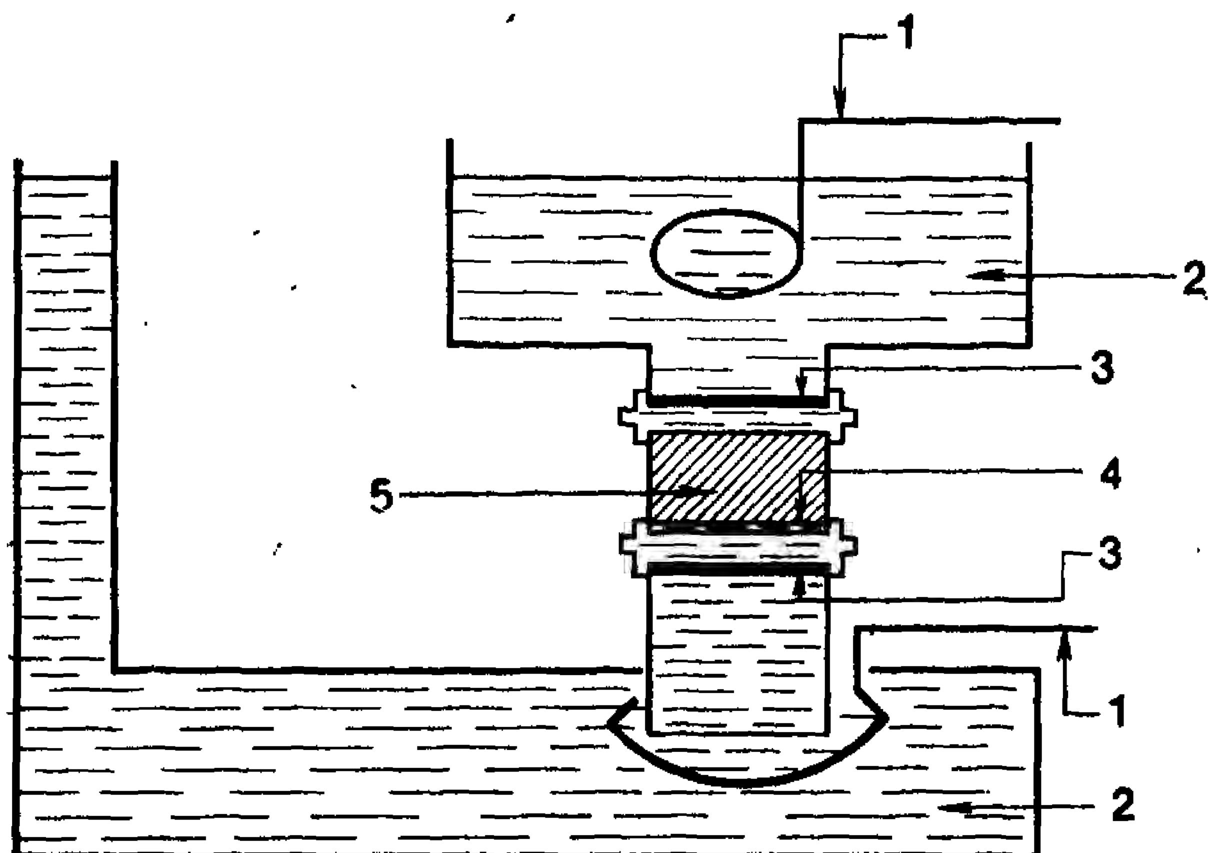


Рис. 4.13. Схема, иллюстрирующая устройство системы электрофоретической элюции сфокусированных белков. Белок концентрируется в небольшом пространстве между фильтром и диализной мембраной. Амфолиты-носители свободно проходят через мембрану. 1 — электрод, 2 — буфер, 3 — диализная мембрана, 4 — фильтр, 5 — сегменты геля. (Stathakos, 1975.)

al., 1973, и Stathakos, 1975, для извлечения белков из ПААГ после препаративного ИЭФ в геле. Белок вместе с амфолитами-носителями подвергается электрофоретической элюции из геля в камеру, на дне которой находится диализная мембрана. Амфолины проходят через мембрану, а белок задерживается в камере, и его удается получить с высоким выходом в виде концентрированного раствора, свободного от амфолинов (см. рис. 4.13, а также разд. 2.2.4 и 2.2.5). Для отделения амфолитов от белков можно использовать также ультрафильтрацию или диализ в полых волокнах (поставляется фирмой Bio Rad). Для обнаружения небольших примесей амфолитов-носителей (порядка микрограмм) в полученных после ИЭФ белковых препаратах было предложено использовать тонкослойную хроматографию (Bloomster, Watson, 1981). Образцы наносят на тонкослойную целлюлозную пластинку и проводят хроматографию в 10%-ной ТХУ. Белки и другие высокомолекулярные компоненты выпадают в осадок и остаются на старте, а примесные амфолиты мигрируют, образуя диффузные нингидрин-положительные зоны с $R_f > 0{,}5$. Эти же авторы описали еще один способ удаления амфолинов — электродиализ в солевом ацетатном буфере pH 4,0 в течение 4 ч. По-видимому, удаления амфолитов-носителей можно добиться и с помощью гидрофобной хроматографии на фенил- или октил-сефарозе — так, как это было сделано в работе Vesterberg, Hansen, 1978, для концентрирования и обессоливания белков из физиологических жидкостей (в част-

ности, белков мочи). Амфолиты весьма гидрофильны и, следовательно, не будут связываться с сорбентом. Хотя подобный метод, по-видимому, можно использовать для отделения белков от амфолинов, он, как показано в работе Gelsema et al., 1980, оказывается непригодным при работе с пептидами.

4.7. Возможные модификации белков в ходе ИЭФ

В работах Jacobs, 1971, 1973, впервые сообщалось о частичной модификации цистеина и метионина до цистеиновой кислоты и метионинсульфоксида, а также о частичной потере тирозина и аргинина при продолжительном ИЭФ бычьей рибонуклеазы. Оба этих эффекта удавалось в значительной мере устранить удалением из колонки растворенного O_2 и добавлением антиоксидантов типа тиодигликолевой и аскорбиновой кислот. В работах Satterlee, Snyder, 1969, и Quinn, 1973, сообщалось о восстановлении Fe^{3+}-миоглобина до оксигемоглобина в процессе ИЭФ. В свете известной склонности миоглобина к аутоокислению, а также окислительных свойств остатков персульфата, присутствующих в геле, такой восстановительный процесс представляется весьма неожиданным. В работе Funatsu et al., 1973, сообщалось о частичной утрате глутаминовой кислоты при ИЭФ восстановленной формы рицина D. Авторы полагают, что это обусловлено присутствием в препарате примесных протеиназ или же тем, что одна из двух полипептидных цепей рицина D сама по себе является протеиназой. О частичном расщеплении белков под действием эндогенных гидролаз при ИЭФ кислых лизосомных гидролитических ферментов (кислой фосфатазы, арилфосфатазы, β-глюкуронидазы, β-галактозидазы и β-N-ацетилгексозаминидазы) сообщалось в работе Needleman et al., 1975. Расщепление удается частично подавить, добавляя в колонку при ИЭФ 0,1%-ную нитрофенилоксамовую кислоту — ингибитор лизосомных нейраминидазы и катепсина D.

По-видимому, наиболее дискуссионным остается вопрос о том, может ли связывание с амфолитами быть причиной артефактной микрогетерогенности белков. Окажись это так, под сомнение пришлось бы поставить все данные о множественных формах белков, которые во многих случаях удается обнаружить с помощью ИЭФ и не удается обнаружить другими методами. В качестве примера можно упомянуть о дискуссии, связанной с микрогетерогенностью бычьего сывороточного альбумина (БСА). Надо все же признать, что случай с БСА не совсем типичен, поскольку этот белок, как известно, обладает сродством ко множеству различных лигандов (Steinhardt et al., 1972). В работе Kaplan, Foster, 1971, приведены данные о том, что более кис-

лый компонент, обнаруживаемый при ИЭФ БСА в градиенте pH 4—6, в действительности представляет собой прочный комплекс между альбумином и каким-то минорным или примесным компонентом в смеси амфолитов. Аналогичные свидетельства в пользу образования комплекса между БСА и (^{14}C)-мечеными амфолитами-носителями были представлены в работе Wallevik, 1973. С другой стороны, эти выводы не нашли подтверждения в опытах по фокусированию БСА в присутствии 6 М мочевины (Salaman, Williamson, 1971; Spencer, King, 1971). По сути дела, авторы двух последних цитированных публикаций отвергают возможность артефактного возникновения микрогетерогенности БСА. В другом случае образование комплекса амфолит—белок было отмечено при работе с кислым белковым компонентом шерсти, отличающимся низким содержанием серы (Frater, 1970). И все же можно отметить, что на сегодняшний день свидетельства в пользу образования прочных комплексов между амфолитами и белками немногочисленны, более того, налицо целый ряд данных, достаточно убедительно отвергающих возможность подобного комплексообразования. Так, при работе с гормоном роста человека и овечьим пролактином в присутствии [^{14}C]-меченных амфолинов удалось достоверно продемонстрировать отсутствие взаимодействия между белками и амфолитами (Baumann, Chrambach, 1975a). Было установлено, что связывания белков с избытком амфолинов практически не происходит, а уровень связывания амфолинов с избытком белка во всяком случае ниже предела чувствительности метода, т. е. менее 0,2 моля амфолинов на 1 моль белка. Аналогичные результаты были получены при работе с белками сыворотки и некоторыми очищенными белками (альбумином, ферритином, β-глюкуронидазой) (Dean, Messer, 1975). Таким образом, в свете последних данных представляется, что появление артефактов при ИЭФ за счет взаимодействий амфолит—белок — это по меньшей мере крайне редкое событие.

При ИЭФ часто приходится сталкиваться с таким явлением, как «кажущаяся» модификация белков, в частности при неблагоприятных условиях среды (pH и/или ионная сила) в зоне внесения образца. Например, в работе Wadström; Smyth, 1975b, было обнаружено, что белки из экстракта цитоплазмы бактерий подвержены сильной адсорбции на «аппликаторе» при внесении образца со стороны катода. Адсорбции удается избежать, если вносить образец со стороны анода. Свести адсорбцию к минимуму обычно удается при введении в гель и в «аппликатор» 4 М мочевины. Присутствие в грубых экстрактах значительной примеси нуклеиновых кислот тоже часто приводит к искажению картины разделения и различиям в характере ИЭФ «анодных» и «катодных» образцов. Этого, как правило, удается избежать

с помощью предварительной обработки экстрактов ДНКазой (Wadström, Smyth, 1975b).

Иногда оказывается, что ввиду индивидуальных особенностей образца для получения адекватной картины ИЭФ его можно вносить только со стороны одного из электродов. Так, при ИЭФ зеинов из маиса, внесенных со стороны анода, наблюдалась высокая гетерогенность. В то же время при внесении образцов со стороны катода не удавалось обнаружить практически ни одной зоны (Soave et al., 1975). То же самое имело место даже при ИЭФ в 6 М мочевине или при нанесении образцов в виде свободного раствора без носителя в лунки или непосредственно на поверхность геля. В конце концов было установлено, что при нанесении образцов вблизи катода, т. е. в щелочной области значений pH, происходит агрегация и преципитация зеинов, даже несмотря на присутствие 6 М мочевины в геле и образце. Таким образом, в данном случае достоверные результаты можно получить при внесении образцов только со стороны анода.

4.8. Источники питания

Со времени появления электрофоретических методов такие факторы, как природа поддерживающей среды, буферные системы, конструкция электрофоретических ячеек и методы охлаждения, подвергались существенным изменениям. В то же время источникам электрического питания уделялось совсем мало внимания. Типичные источники питания различались между собой только по величине предельной мощности и по режиму стабилизации — «постоянный ток» или «постоянное напряжение».

Не так давно появилось второе поколение источников питания, которые могут работать как в режиме стабилизации по току, так и в режиме стабилизации по напряжению, а также автоматически переключаться с одного режима на другой. С появлением ИЭФ возникла необходимость в создании третьего поколения источников со стабилизацией по мощности. Поскольку повышение разности потенциалов при ИЭФ способствует увеличению скорости миграции белков к положению равновесия и образованию узких сфокусированных зон, разумно проводить процесс при максимальном напряжении, но не допуская избыточного выделения тепла (которое пропорционально квадрату приложенного напряжения). Предельно допустимая величина электрической мощности, которую можно считать оптимальной (Schaffer, Johnson, 1973), зависит от электропроводности системы и от эффективности рассеяния джоулева тепла. Последнюю можно оценить, помещая в разделительную колонку термический зонд. После того как для данной системы установлена оп-

тимальная мощность, весь процесс фокусирования можно проводить в изотермических условиях.

В работе Schaffer, Johnson, 1973, была предложена конструкция регулятора, с помощью которого обычный источник постоянного тока можно преобразовать в источник питания со стабилизацией по мощности. Был описан также источник постоянной мощности с предельными значениями электрических параметров 3000 В, 300 мА и 300 Вт, сделанный на основе источника постоянного напряжения, к которому подключался регулятор мощности, подающий сигнал на реверсивный синхронный движок (5 об./мин), используемый в качестве сервомотора (Soderholm, Lidström, 1975).

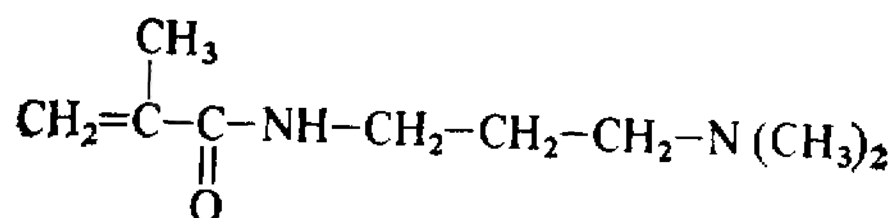
В настоящее время целый ряд фирм (в частности, LKB, Pharmacia, Bio Rad) поставляет источники постоянной мощности, обеспечивающие напряжение до 3000 В, силу тока до 200 мА, мощность до 150 Вт и, таким образом, удовлетворяющие требованиям практически любой системы ИЭФ. С появлением источников постоянной мощности стало возможным проведение высокоскоростного ИЭФ за счет использования максимального напряжения в условиях контролируемого выделения тепла. Например, как уже упоминалось (см. разд. 2.1.1.), при фокусировании на колонке с использованием источников постоянной мощности равновесие достигается за 15—20 ч при максимальной мощности 15 и 30 Вт и максимальном напряжении 1600 и 2000 В в случае колонок LKB 8100-1 и LKB 8100-2 соответственно. В этих условиях температура в колонке была постоянна и лишь на несколько градусов превышала температуру охлаждающей жидкости, что контролировалось с помощью игольчатых термисторов, установленных на различных уровнях в колонках обоих типов. В работе Lundin et al., 1975, рекомендуется проводить ИЭФ не дольше 20 ч, чтобы избежать искажения и даже разрушения градиента pH, которые могут происходить при очень продолжительном фокусировании. При ИЭФ в тонком слое прикладываемую электрическую мощность можно повышать до 20—25 Вт, не опасаясь искажения градиента pH или тепловой денатурации белков. При этом во избежание значительного катодного дрейфа фокусирование не должно продолжаться более 2 ч.

4.9. Катодный дрейф

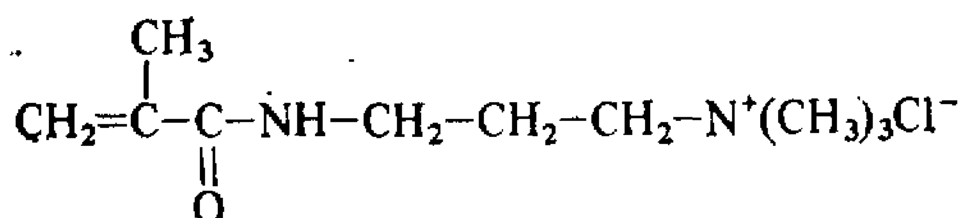
Уже в самых первых экспериментах по ИЭФ в геле стало ясно, что рассматриваемое в теории метода равновесное состояние (Svensson, 1961, 1962a,b) со стационарным распределением амфолитов-носителей и белковых зон быстро подвергается искажению, которое проявляется в смещении образцов и амфо-

линов преимущественно к катоду. Такая дестабилизация градиента pH получила название «эффект плато» (Finlayson, Chrambach, 1971; Chrambach et al., 1973) в связи с тем, что она сопровождается образованием более пологого участка в центральной области градиента. Другое название — «катодный дрейф» (Righetti, Drysdale, 1971, 1973) — отражает основное направление смещения зон. Весьма наглядной иллюстрацией этого явления может служить серия картин разделения, полученная в процессе 8-часового ИЭФ гемоглобинов, которая приведена в публикации Davies, 1975. Катодный дрейф наблюдается и в том случае, когда вместо амфолинов используют другие буферные компоненты (Nguyen, Chrambach, 1976) или когда в качестве электродных растворов вместо сильных кислот и оснований используют буферные электролиты (Nguyen, Chrambach, 1977a). Даже в тех условиях, когда, как считалось, была достигнута стабилизация градиента pH, наблюдался дрейф зон по направлению к катоду (Nguyen, Chrambach, 1977b,c). Для объяснения дестабилизации градиента pH было предложено семь различных гипотез (Haglund, 1975; Righetti, Drysdale 1976): (1) электрофоретическая миграция амфолитов-носителей в изоэлектрическом состоянии; (2) электроэндосмос; (3) образование зоны чистой воды на нейтральном участке градиента pH; (4) фокусирование воды (которую можно считать амфолитом), приводящее к ее накоплению в нейтральной области градиента и последующему оттоку к периферийным участкам геля; (5) исходная недостаточность некоторых амфолитов или их постепенная деструкция в ходе ИЭФ; (6) постепенное накопление или потеря амфолинами какого-либо заряженного комплексообразующего компонента; (7) диффузия амфолинов из геля и (или) электролитов в гель. Некоторые гипотезы получили экспериментальное подтверждение в работах Fawcett, 1975d, и Baumann, Chrambach, 1975. Кроме того, были выдвинуты гипотезы о взаимодействии между амфолитами, а также о наличии в смеси «плохих» амфолитов, которые также могут быть причиной катодного дрейфа (Gianazza et al., 1979; Arosio et al., 1978). В работе Delincée, 1980, утверждается, что катодный дрейф обусловлен электроэндосмосом и поглощением CO_2 из воздуха на катодном участке геля. Фундаментальный обзор литературных данных по этому вопросу содержится в публикации Rilbe, 1977. Автор приходит к следующему выводу: «В большинстве случаев дестабилизацию градиента можно объяснить электроосмотическим течением воды, а также транспортом связанной (гидратационной) воды и вторичными эффектами». На сегодняшний день наиболее общепринятой можно считать концепцию, выдвинутую группой Крамбаха (Nguyen, Chrambach, 1975, 1977a—c; An der Laan, Chrambach, 1980). Авторам удавалось подавить ка-

тодный дрейф, постепенно повышая pH в анолите (т. е. фактически снижая концентрацию протонов у анода). Это согласуется с результатами компьютерного моделирования градиента pH, которые указывают на то, что стабильность градиента может зависеть от баланса между подвижностями и концентрациями протонов и гидроксил-ионов, мигрирующих в противоположных направлениях (Murel et al., 1979). Другими словами, согласно вышеупомянутой концепции, «протонное облако» движется от анода к катоду быстрее, чем встречное «гидроксильное облако», что в итоге приводит к возникновению дрейфа по направлению к катоду. Таким образом, по этой гипотезе при выравнивании величин (молярность H^+) × (подвижность H^+) и (молярность OH^-) × (подвижность OH^-) катодный дрейф должен полностью прекратиться. Однако в действительности этого, по-видимому, не происходит (Delincée, 1980). Ввиду того что предлагавшиеся ранее подходы не давали удовлетворительных результатов, мы попытались найти более эффективное средство избавления от катодного дрейфа. Нам удалось показать, что полиакриламидная матрица действительно несет отрицательные заряды, образовавшиеся в результате: (а) включения в гель примесей акриловой кислоты, (б) ковалентного включения в матрицу остатков инициаторов полимеризации (персульфата или рибофлавин-5′-фосфата) в виде концевых групп полиакриламидных цепей и (в) гидролиза амидных групп остатков акриламида в слое геля, лежащем под катодной полоской фильтровальной бумаги (Righetti, Macelloni, 1982). Мы пришли к выводу, что единственный эффективный способ подавления дестабилизации градиента при ИЭФ — это получение «сбалансированных матриц», т. е. ковалентное включение третичных или четвертичных аминогрупп в количествах, компенсирующих суммарный отрицательный заряд матрицы. Для этого мы использовали 3-диметиламинопропилметакриламид (ДМАПМА) или метакриламидопропилтриметиламмонийхлорид (МАПТАХ), структурные формулы которых приведены ниже:



ДМАПМА



МАПТАХ

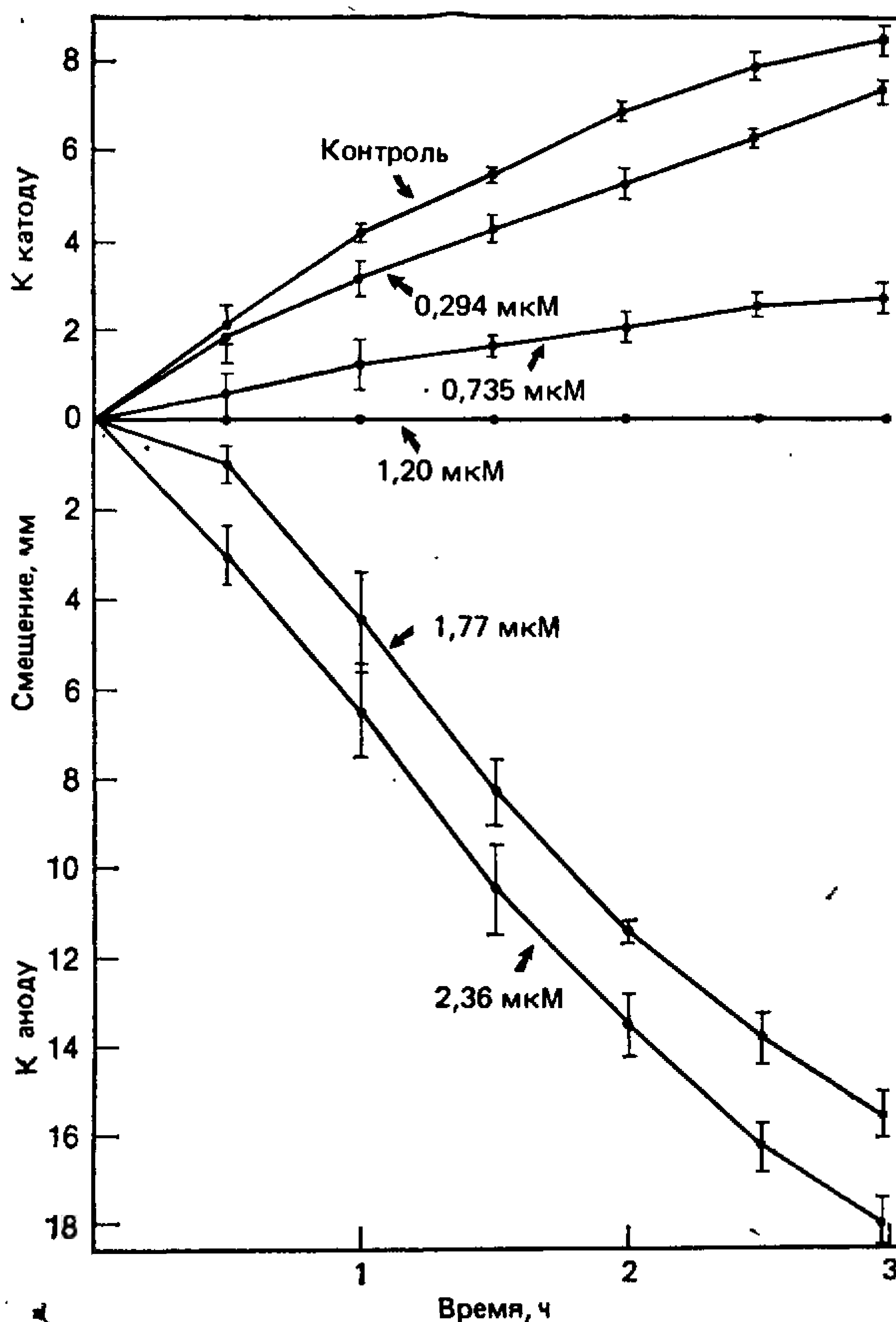


Рис. 4.14. Влияние основания (третичного амина) на катодный дрейф. Полимеризация геля осуществлялась как в отсутствие (контроль), так и в присутствии 3-диметиламинопропилметакриламида (ДМАПМА) в диапазоне концентраций от 0,294 до 2,96 мкМ. Характерно, что при концентрациях ДМАПМА выше эквивалентной (т. е. выше 1,20 мкМ) сфокусированные гемоглобиновые зоны начинают смещаться к аноду (обратный «анодный» дрейф). ИЭФ проводилось при 10 °С в геле толщиной 360 мкм с $T=6\%$, $C_{бис}=4\%$, содержащем 2% амфолинов рН 3,5—10. Префокусирование — 20 мин, фокусирование нормального гемоглобина взрослого человека — 1 ч. Отсчет времени на оси абсцисс приведенного графика начинается по истечении указанных 80 мин. Катодное (или анодное) смещение зон определяли при постоянном значении напряжения 1000 В (100 В/см). (Righetti, Macelloni, 1982.)

Введение постепенно увеличивающихся количеств ДМАПМА в гель вызывает постепенное снижение катодного дрейфа до нуля в точке эквивалентности. При включении избыточного количества ДМАПМА изменяется направление дрейфа, который, таким образом, становится уже «анодным дрейфом» (рис. 4.14).

Итак, ввиду того что в зависимости от суммарного заряда матрицы может наблюдаться катодный дрейф, «нулевой» дрейф (сбалансированные матрицы) или анодный дрейф, можно полагать, что главной причиной дестабилизации градиента pH при ИЭФ в геле является электроэндосмос. В то же время катодный дрейф может быть отчасти связан и со структурными особенностями самих амфолитов-носителей (Bjellqvist, личное сообщение), катионная форма которых характеризуется в среднем на 5% более высокой подвижностью, чем анионная. Это проявляется в медленном смещении градиента pH к катоду. И все же «сбалансированные гели», а также разработанные недавно системы с иммобилизованными градиентами pH (Bjellqvist et al., 1982a,b), судя по всему, позволяют окончательно избавиться от неприятностей, связанных с явлением катодного дрейфа.

4.10. Неполадки и их устранение[1]

Проблема: плохая полимеризация, слишком большое время гелеобразования (полиакриламидные гели).

Причины и меры по устранению.

а. *Неправильный состав смеси* (слишком низкие значения *T* и *C*).

б. *Недостаточное количество инициатора* (персульфата, рибофлавина) *или катализатора (ТЕМЭД) полимеризации.* Все же не следует повышать концентрацию более чем в 1,5 раза для персульфата и более чем в 2 раза для ТЕМЭД по сравнению с рекомендуемыми значениями (Righetti, Macelloni, 1982).

в. *Некачественный инициатор;* персульфат разлагается в растворе, поэтому следует готовить свежий раствор не реже, чем раз в неделю, и хранить его при 4 °C.

г. *Неподходящий инициатор;* в щелочной среде рибофлавин практически неактивен.

д. *Слишком низкая температура,* однако при использовании персульфата температура все же не должна превышать 45—50 °C.

е. *Неправильное освещение;* при инициации рибофлавином следует использовать источники ультрафиолетового, а не видимого света, т. е. флуоресцентные трубки, а не лампы накаливания. Формы для полимеризации геля не следует делать из материалов, сильно поглощающих в УФ-области. Обычно в этом случае пользуются тонкими стеклами, а не толстыми пластиковыми пластинами.

ж. *Присутствие ингибиторов. Кислород из воздуха:* готовый раствор следует тщательно деаэрировать, уравновесить азотом

[1] Этот раздел написан д-ром *E. Gianazza.*

и немедленно залить в форму. *Спирты, меркаптаны, пыль:* не следует вымачивать пластиковые и резиновые части формы для полимеризации в мыльном растворе.

з. *Контакт с воздухом при полимеризации:* приводит к образованию неровной верхней кромки. Следует использовать закрытую форму или после заполнения формы сверху осторожно наслоить воду.

Проблема: слишком высокий ток, чрезмерно высокая температура геля.

Причины и меры по устранению.

Избыток соли в геле (неправильный состав, слишком большая концентрация персульфата) *или в образцах* (в этом случае ток резко возрастает только после внесения образцов). Образцы следует диализовать против раствора амфолитов (глицина, амфолитов-носителей соответствующего диапазона pH) или слабого буфера (предпочтительно $(NH_4)_2CO_3$, трис-CH_3COOH, трис-глицина и т. п.). Если электропроводность в начале была нормальной, но в ходе эксперимента не уменьшается, то это может означать, что произошла ошибка в полярности электродов. Следует проверить pH в электродных полосках. Исправить ошибку (если она действительно произошла) невозможно. Если в ходе ИЭФ электропроводность неожиданно возрастает, это означает, что происходит короткое замыкание (см. ниже — «подгорание геля»). Следует немедленно отключить ток и удалить избыток жидкости с поверхности геля.

Проблема: подгорание геля.

Причины и меры по устранению.

а. *Испарение жидкости по всей поверхности геля* означает, что система перегрета из-за превышения допустимой электрической мощности или неэффективного охлаждения.

б. *Подгорание геля по краям* означает, что электродные полоски слишком длинны (они должны быть на несколько миллиметров короче геля). Другая возможная причина — затеки жидкости у краев геля. Укоротить полоски, удалить воду, обрезать и удалить подгоревшие края.

в. *Подгорание геля у катодной полоски:* образование зоны чистой воды. Может происходить при использовании неподходящего католита (подобрать менее основный); можно также расширить градиент pH в щелочную область, добавив некоторое количество амфолитов-носителей диапазона pH 6—8 или 3—10. При длительных опытах может происходить частичный гидролиз матрицы; если нанесение образцов занимает много времени, то электродные полоски лучше накладывать после нанесения образцов, непосредственно перед ИЭФ.

г. *Подгорание в центральной части геля:* слишком высокое содержание соли в образце.

Проблема: «волны» на поверхности геля

Причины и меры по устранению.

а. *Волны со стороны анода:* высокое содержание связанного CO_2 в католите; следует использовать свежий раствор и держать его в плотно закрытой посуде. Проблему удается отчасти разрешить, вводя в состав геля глутаминовую и (или) аспарагиновую кислоты (2—5 мМ) или некоторое количество амфолитов широкого диапазона pH (3—10).

б. *Волнистость наблюдается в отдельных треках:* слишком высокое содержание соли в образцах. *Волнистость в зоне нанесения образцов:* кусочки фильтровальной бумаги, использованные для нанесения образцов, следует удалить с поверхности геля примерно через полчаса; лунки в геле заполнить разбавленным раствором амфолитов.

Проблема: преципитация образца.

Причины и меры по устранению.

а. *Четкие линии: изоэлектрическая преципитация.* Можно снизить загрузку образцом, использовать крупнопористые гели. Взаимодействие с амфолитами-носителями обнаружено только для полианионов: можно использовать дезагрегирующие агенты.

б. *Преципитация в зоне нанесения: наличие высокомолекулярных компонентов.* Следует использовать или более крупнопористые полиакриламидные, или агарозные, или гранулированные гели. При наличии водонерастворимых компонентов вводят добавки (детергенты, мочевину, для некоторых глобулинов— глицин). *Неблагоприятное значение pH в зоне нанесения:* переместить зону нанесения к аноду или катоду. В первом опыте лучше наносить образец в нескольких различных участках геля; таким образом можно одновременно решить и вышеупомянутую проблему, и подобрать условия минимизации времени фокусирования. При работе с компонентами, склонными к агрегации, следует ввести в гель детергенты или мочевину, если это допустимо (для большинства белков допустимо присутствие по крайней мере 2 М мочевины). Иногда полезно ввести в образец тиолсодержащие соединения, а в тех случаях, когда возможно ион-парное взаимодействие с амфолитами, — изменять место внесения образца.

Проблема: нестабильность градиента pH (катодный дрейф).

Причины и меры по устранению.

а. *Наличие связанных с матрицей зарядов: избыток инициаторов полимеризации, примеси акриловой кислоты.* Перекристаллизовать акриламид, пропустить раствор акриламида через ионообменник, ввести в гель дополнительные положительно заряженные группы (Righetti, Macelloni, 1982). Отчасти проблему удается решить, повышая вязкость среды с помощью сахарозы, глицерина или мочевины (использование последней наи-

более эффективно, но не всегда допустимо). Можно также повысить % *T* и расширить градиент в щелочную область. В этой ситуации очень важно установить минимальное время фокусирования и не превышать его.

б. Отклонение профиля pH от ожидаемого может наблюдаться в тех случаях, когда образец в значительном количестве содержит *примеси амфотерных электролитов, а также слабых кислот или оснований.*

Проблема: аномальные явления на поверхности геля.

Причины и меры по устранению.

а. *Жидкость на поверхности геля: неполная полимеризация.* Полностью удалить жидкость с помощью листка фильтровальной бумаги осторожными движениями, избегая прилипания бумаги к гелю.

б. *Жидкость скапливается у катода: катодный дрейф* (см. выше). Наложить полоску фильтровальной бумаги шириной 2—3 см, свободно свисающую с внешней стороны геля и на 3—4 мм заходящую на катодную полоску.

в. *Кусочки фильтровальной бумаги,* использованные для внесения образцов, *прилипли к поверхности геля.* Следует смочить их избыточным количеством воды, подождать несколько секунд, удалить вместе с избытком воды.

г. *Появление кристаллов мочевины: слишком интенсивное охлаждение* при фокусировании или при хранении (для 8 М мочевины температура должна быть не ниже 10 °С) *или пересыхание геля.* В последнем случае следует уменьшить доступный объем свободного пространства вокруг геля — поверх электродов можно положить стеклянную пластину, по бокам под пластину подложить увлажненные прокладки из фильтровальной бумаги. Отдельные кристаллики мочевины можно растворить в нескольких каплях воды. В действительности влияние кристаллизации мочевины, как правило, далеко не так опасно, как может показаться на первый взгляд.

д. *Вспенивание у электродов в присутствии детергентов* обусловлено переносом воды (дрейф градиента) и выделением пузырьков H_2 и O_2 (продукты электролиза). Для предотвращения короткого замыкания скопившуюся жидкость необходимо удалить (см. выше). Следует воспользоваться двойными положенными друг на друга электродными полосками.

4.11. Артефакты. Общий анализ

С повсеместным внедрением метода ИЭФ стало ясно, что микрогетерогенность белков — это чрезвычайно распространенное явление, причины и физиологическое значение которого окончательно не установлены. Напротив, об абсолютно гомо-

генном белковом препарате теперь можно говорить только как о несбыточной мечте. В начале семидесятых годов целый ряд биохимических журналов отказывался принимать статьи, связанные с использованием ИЭФ, считая, что полученные этим методом результаты основаны на артефактном фракционировании. К счастью, на сегодняшний день этот «кризис доверия» удалось в основном преодолеть. Микрогетерогенность можно объяснить целым рядом причин: (а) существованием конформеров; разные компоненты могут представлять собой несколько альтернативных устойчивых конформационных состояний одного и того же вещества; (б) наличием нескольких олигомерных комбинаций между различными субъединицами; (в) неравномерным распределением углеводных остатков между молекулами данного белка (в случае гликопротеинов); (г) различиями в степени фосфорилирования, метилирования или ацетилирования белков (часто имеет место в случае ядерных белков); (д) влиянием ограниченного протеолиза, особенно в процессе выделения белка; (е) частичным дезаминированием остатков аспарагина и глутамина; (ж) наличием прочно связанных с белком кофакторов или ингибиторов; микрогетерогенность в этом случае может дополнительно возрастать из-за вариаций заряда указанных лигандов, обусловленных, в частности, окислительно-восстановительными процессами.

Различные варианты возникновения гетерогенности по заряду рассматриваются в обзорах Epstein, Schechter, 1968; Kaplan, 1968; Williamson et al., 1973, и Righetti, Drysdale, 1976. Имеются сообщения о том, что в некоторых случаях наблюдаемая гетерогенность, по-видимому, является артефактом и обусловлена особенностями самого метода ИЭФ (см. разд. 4.7), однако ни в одном из этих случаев строгих доказательств такому утверждению не получено. Нам удалось обнаружить некоторые особые классы веществ, ИЭФ которых и в самом деле сопровождается появлением артефактной гетерогенности. Однако первичная структура и пространственная конфигурация этих веществ не имеют ничего общего с теми типами структуры, которые свойственны всем известным белкам. Далее мы рассмотрим такие особые случаи и для каждого из них дадим интерпретацию соответствующих явлений, лежащих в основе возникновения микрогетерогенности при ИЭФ.

1. *ИЭФ нуклеиновых кислот.* Первое сообщение о фракционировании тРНК методом ИЭФ появилось в публикации Righetti, Drysdale, 1972. За ним последовал еще ряд работ, посвященных изоэлектрическому фракционированию α- и β-глобиновых мРНК, а также рибосомных 18S- и 28S-РНК из ретикулоцитов кролика (Shafritz, Drysdale, 1975; Drysdale, 1977). Сам факт разделения этих компонентов с помощью ИЭФ с точки зрения

теории является несколько неожиданным. Поскольку метод ИЭФ основан на разделении только по заряду, то он, вообще говоря, должен быть индифферентен к полидисперсности по молекулярной массе при условии постоянства отношения заряда к массе. Более того, расчетное истинное значение pI для тРНК (и, возможно, для большинства других нуклеиновых кислот) составляет около 2,6 (Morris, 1978). В то же время оказалось, что «кажущиеся значения pI» ($pI_{каж}$) для всех исследованных РНК находятся в диапазоне pH 3,5—5,2. Внимательный анализ опубликованных данных выявляет следующее:

(а) в случае ИЭФ тРНК число и относительное распределение сфокусированных зон зависят от способа внесения образца и от количественного соотношения тРНК : амфолины;

(б) картина распределения зон тРНК при ИЭФ существенно изменяется в присутствии 6 *М* мочевины (резко уменьшается число зон и заметно снижаются значения $pI_{каж}$);

(в) при выделении индивидуальных фракций сфокусированной тРНК и повторном их фокусировании вновь обнаруживалась микрогетерогенность, хотя и выраженная в меньшей степени, чем при первом фракционировании;

(г) рибосомные РНК «фокусируются» в зонах, соответствующих $pI_{каж}$ 4,8 (для 18S) и 5,2 (для 28S), однако характер миграции этих РНК от катода (область внесения образца) к аноду скорее свидетельствует о фракционировании «по размеру», а не «по заряду». И действительно, обе зоны имеют характерные «хвосты» со стороны катода. Кроме того, в то время как зоны 18S- и 28S-РНК только начинают мигрировать в геле, нанесенная одновременно 4S-РНК уже успевает пройти значительную часть пути к аноду и «фокусируется» при значении $pI_{каж}$ 4,0;

(д) аналогично α-глобиновая мРНК мигрирует несколько быстрее ($pI_{каж}$ 4,7—4,8), чем β-глобиновая ($pI_{каж}$ 5,1—5,2), которая, как известно, несколько крупнее первой.

Таким образом, эти наблюдения определенно свидетельствуют о том, что так называемое «изоэлектрическое» фракционирование нуклеиновых кислот (Drysdale, 1977) по сути дела имеет неизоэлектрическую природу. В работе Galante et al., 1976, из данных по изменению температур плавления тРНК в присутствии амфолинов был сделан вывод, что в основе разделения нуклеиновых кислот при ИЭФ лежит образование прочных комплексов между ними и амфолитами-носителями, формирующими градиент pH. Прочность таких комплексов сильно зависит от pH — они практически не образуются в нейтральной области (pH 7,4), малоустойчивы при pH 5,4 и очень прочны при pH 4,2 и ниже, т. е. в характерной области кажущегося «фокусирования» и фракционирования тРНК.

2. *ИЭФ гепарина.* Было показано, что с помощью ИЭФ можно разделить гепарин на 21 компонент со значениями $pI_{каж}$ в диапазоне от 3,2 до 4,2 [Nader et al., 1974; McDuffie et al., 1975]. Считалось, что разделение обусловлено различиями в молекулярной массе: наименьший размер (M_r 3000) имеют самые «кислые» компоненты, а наибольший (M_r 37 800) — самые «оснóвные». При этом различия в мол. массе между соседними зонами составляют около 1500—2000. Фракционирование гепарина с помощью ИЭФ само по себе еще более достойно удивления, чем разделение нуклеиновых кислот, поскольку если последние обладают свойствами амфотерных электролитов, то гепарин является типичным полианионом и не содержит никаких положительных противоионов. Позднее было замечено, что различные препараты гепарина, сильно различающиеся по молекулярной массе входящих в их состав компонентов, при ИЭФ дают заметное количество общих зон (Johnson, Mulloy, 1976). Это свидетельствует о том, что картина разделения гепарина при ИЭФ определяется не только различиями в значениях M_r, несмотря на то что наиболее низкомолекулярные компоненты действительно мигрируют в геле с большей скоростью и «фокусируются» в наиболее кислой области градиента pH.

Механизм фракционирования гепарина был исследован в работах Gianazza, 1978, и Righetti et al., 1978. На основании спектрального исследования гепарина в растворе и в геле после ИЭФ, а также на основании данных, полученных при повторном ИЭФ индивидуальных сфокусированных зон, при ИЭФ в присутствии и в отсутствие мочевины, при различных количественных соотношениях гепарин : амфолины и при работе с гепаринами, которые различаются по уровню карбоксилирования и сульфирования, было продемонстрировано, что наблюдаемая артефактная гетерогенность гепарина при ИЭФ обусловлена главным образом его взаимодействием с амфолитами-носителями. В частности, появление 21 зоны при ИЭФ обусловлено образованием комплексов между одинаковыми макромолекулами гепарина и различными компонентами смеси амфолинов. Эти комплексы заметно различаются по прочности. Наименее прочные комплексы, которые легко разрушаются при действии красителя толуидинового голубого, характеризуются наиболее высокими значениями $pI_{каж}$. В то же время наиболее «кислые» комплексы очень прочны и не подвержены дезагрегации под действием избытка оснóвного красителя. Было обнаружено, что в зависимости от количественного соотношения гепарин : амфолины в растворе может заметно изменяться стехиометрия комплексов. В случае избытка амфолинов они ориентируются перпендикулярно гепариновой цепи таким образом, что одна концевая аминогруппа каждой молекулы амфолинов нейтрализует

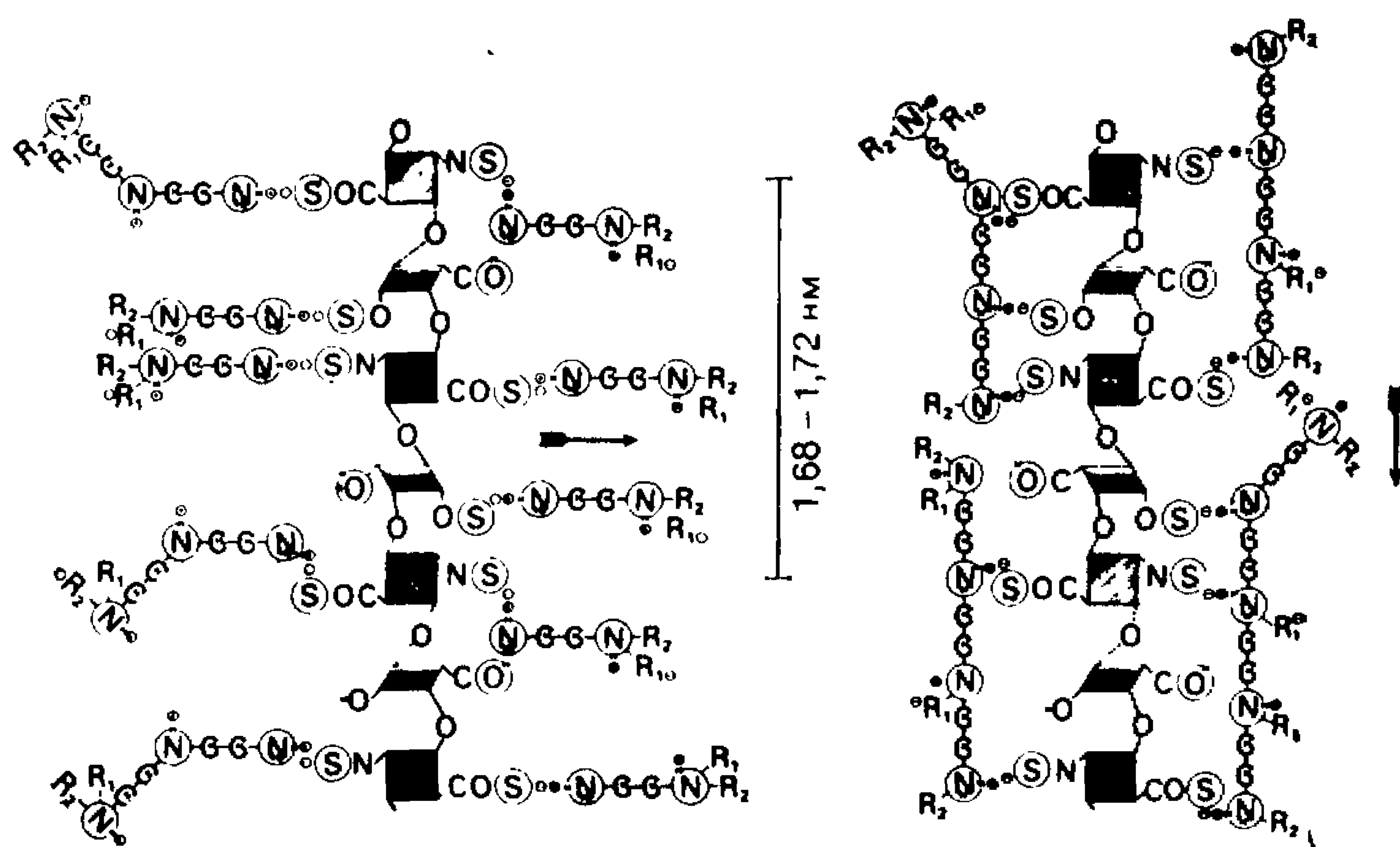


Рис. 4.15. Модель взаимодействия между молекулами гепарина и амфолинов. Слева изображен вариант агрегации при молярном избытке амфолинов, например в том случае, когда на каждую единицу заряда гепариновой цепи приходится по одной молекуле амфолинов. Справа изображен комплекс, образующийся в присутствии относительного избытка гепарина, например в том случае, когда на каждые три гепариновых заряда при pH=3,5 приходится по одной молекуле амфолинов. Обратите внимание на то, что при переходе от одной из этих двух крайних структур к другой изменяется пространственная ориентация молекул амфолинов: от перпендикулярной оси гепариновой спирали к параллельной. (Righetti et al., 1978.)

один отрицательный заряд гепариновой макромолекулы. В этих условиях количество амфолинов, связанных с гепарином, по массе примерно вдвое превышает массу самого гепарина, т. е. из исходного полимера с M_r 12 600 образуется комплекс с M_r около 37 000. При избытке гепарина связанные молекулы амфолинов ориентированы вдоль гепариновой цепи так, что одна амфотерная молекула своими аминогруппами нейтрализует примерно три отрицательно заряженные группы гепарина. На рис. 4.15 показаны обе модели, отражающие два крайних случая связывания. Понятно, что в действительности могут реализоваться и самые разнообразные промежуточные структуры. В обоих случаях свободные протонированные аминогруппы молекул амфолинов могут участвовать в образовании «поперечных сшивок», или мостиков, между различными гепариновыми цепями, способствуя формированию крупных макромолекулярных агрегатов.

3. *ИЭФ полианионов.* Сейчас уже стало ясно (Gianazza, Righetti, 1978), что рассмотренные выше факты аномального фракционирования нуклеиновых кислот и гепарина есть лишь частные случаи проявления значительно более общей закономерности. Эта закономерность заключается в том, что любые

полианионы склонны к комплексообразованию с амфолитами-носителями в диапазоне pH 3,2—5,0 (рис. 4.16). Как уже отмечалось, сродство амфолинов к полианионам очень сильно зависит от pH и при pH 3 примерно в 10 000 раз выше, чем при pH 7. Это скорее всего связано с тем, что при pH 3 компоненты смеси амфолинов представляют собой цепочку из 4—5 протонированных аминогрупп (разделенных диметиленовыми звеньями). Их карбоксильные группы при таком pH практически не заряжены, что способствует образованию прочных комплексов между амфолинами и полиаминами. При pH 7 наблюдается изменение знака суммарного заряда амфолинов, образующиеся анионные компоненты отталкиваются от отрицательно заряженных полианионов (Righetti et al., 1978). Прочность связывания амфолитов-носителей зависит также от природы отрицательных

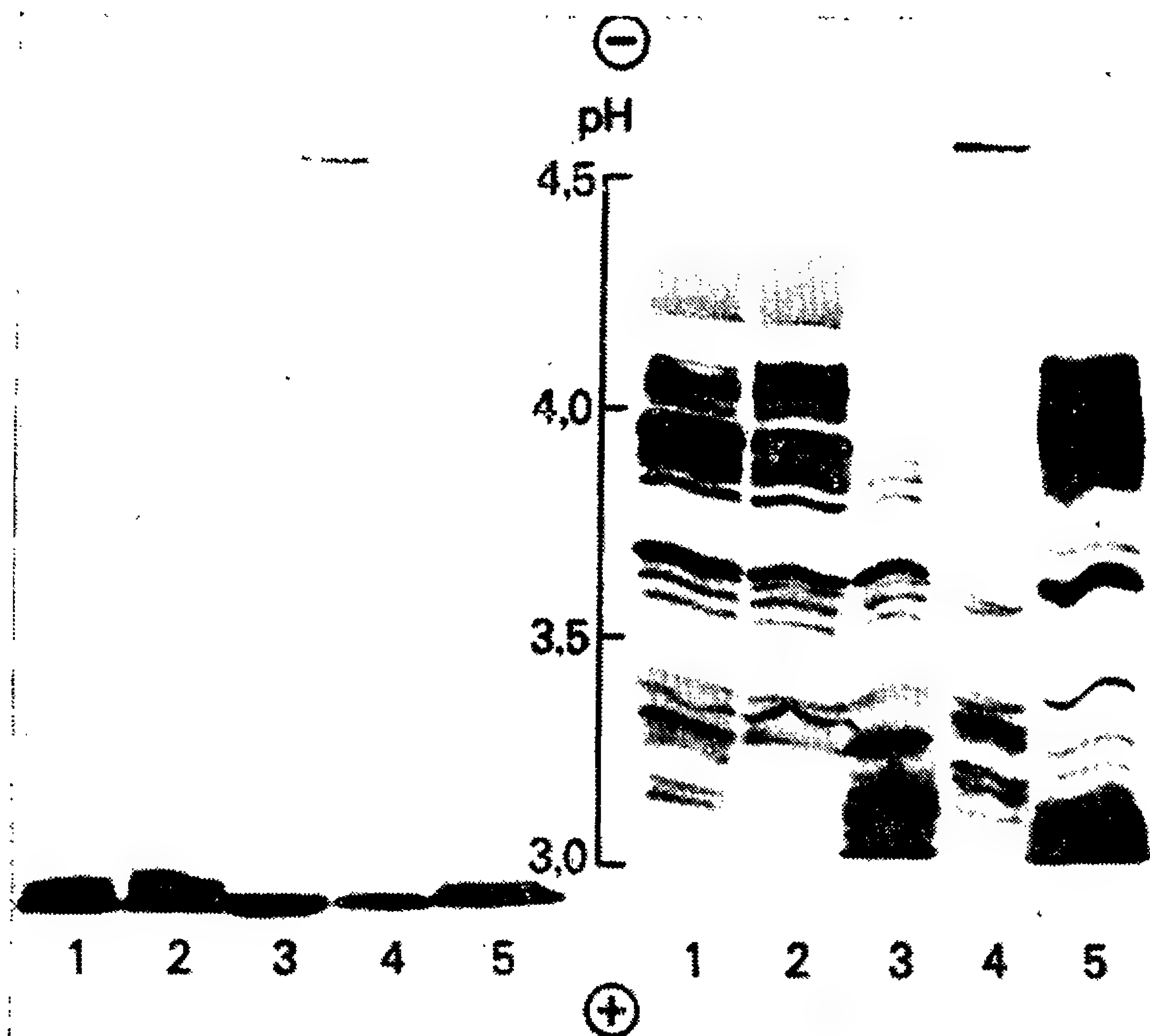


Рис. 4.16. ИЭФ полианионов в 5%-ном акриламидном геле, содержащем 2% амфолинов pH 2,5—5 в отсутствие (*справа*) и в присутствии (*слева*) 8 М мочевины. 1 — гепарин А, 2 — гепарин В, 3 — гепарин В с частично восстановленными карбоксильными группами, 4 — полигалактуроновая кислота, 5 — полиглутаминовая кислота. Зоны обнаруживали с помощью окрашивания толуидиновым синим. (Righetti et al., 1978.)

зарядов, от плотности их распределения и пространственной ориентации в полианионной цепи. В зависимости от этих факторов прочность образующихся комплексов убывает в ряду полифосфаты>полисульфаты>поликарбоксилаты. Для полианионов, содержащих однотипные заряженные группы, на прочности связывания сказываются плотность распределения и пространственная ориентация зарядов. Так, полиглутаминовая кислота образует более прочные комплексы, чем полигалактуроновая. Для реализации сколь-нибудь прочного связывания полианион должен содержать, вероятно, не менее шести заряженных групп, что было продемонстрировано на примере гексаметафосфата.

4. *ИЭФ красителей.* При фокусировании кислых красителей (в основном содержащих от одной до четырех сульфогрупп) пришлось столкнуться с явлениями такого же типа, что и при ИЭФ различных полианионов (Righetti et al., 1977). Это казалось странным, достаточно неожиданным и не очень согласовывалось с интерпретацией, выдвинутой ранее для других случаев артефактной гетерогенности. Однако на сегодняшний день уже ясно, что в основе этого явления лежит тот же самый принцип комплексообразования. Отличие заключается в том, что при ИЭФ красителей в роли основной многозарядной цепи выступают сами молекулы амфолинов, с каждой из которых могут связываться одновременно до четырех и даже пяти молекул красителя. Более того, молекулы красителя могут образовывать поперечные сшивки между амфолиновыми цепями, формируя таким образом пространственную сетку агрегатов, склонных к преципитации в ходе фокусирования. И действительно, даже при простом добавлении в пробирку с раствором какого-либо из полианионов раствора амфолинов, подкисленного до pH 3, наблюдается помутнение, а в отдельных случаях и выпадение осадка. То же самое происходит и с растворами большинства из опробованных кислых красителей. Само собой разумеется, что «неизоэлектрическая преципитация» такого рода не происходит при подкислении до pH 3 растворов полианионов или красителей в отсутствие амфолинов. Разрушить образующиеся комплексы можно было только путем изменения диэлектрической проницаемости растворителя или повышением температуры, а также одновременным изменением обоих параметров. По силе диссоциирующего действия наиболее широко используемые дезагрегирующие агенты [при одинаковой молярности] можно расположить в ряд диметилформамид—тетраметилмочевина>диметилсульфоксид>мочевина>формамид (см. рис. 4.5). Мы предположили, что в основе агрегации лежит двухстадийный процесс. На первой стадии образуется прочный, практически недиссоциирующий ионный комплекс между амфолинами и моле-

кулами красителя. На второй стадии реализуются гидрофобные взаимодействия между связанными молекулами красителя.

5. *ИЭФ поликатионов.* Из общих соображений представляется совершенно естественным сделать следующий шаг и проверить, не могут ли аналогичные явления происходить и на другом «полюсе» шкалы pH. И в самом деле, при работе с poly (Arg) (Gianazza, Righetti, 1980) оказалось, что прочность образующегося комплекса настолько велика, что после внесения этого поликатиона со стороны анода в гель с предварительно сформированным градиентом pH в процессе миграции к катоду он увлекает за собой сфокусированные амфолины. Преципитация комплекса в виде размазанного пятна происходит в диапазоне pH 7—8, т. е. там, где амфолиты-носители могут существовать в форме анионов. Таким образом, искаженный профиль распределения амфолинов может свидетельствовать о том, что происходит комплексообразование рассмотренного типа. При этом важно знать, не содержат ли образцы избыточного количества солей, которые также могут заметно искажать профиль фокусирования амфолинов. Следует отметить, что подобное комплексообразование характерно, по-видимому, только для poly (Arg). Poly (Lys) образует очень слабые комплексы с амфолинами, а возможно, не образует их совсем. Фокусирование poly (His) тоже не сопровождается комплексообразованием. Кроме того, известно, что гистоны беспрепятственно проходят по всей длине геля и собираются на катодной полоске, не проявляя при этом никаких признаков комплексообразования с амфолинами.

Возможность появления рассмотренных выше артефактов была подкреплена теоретическими расчетами в работах Cann, Stimpson, 1977; Stimpson, Cann, 1977, и Cann et al., 1978. Впрочем, авторы рассматривали лишь бинарную модель, т. е. расщепление одного пика на два за счет взаимодействия с амфолитами-носителями. Только продемонстрировав профиль ИЭФ гепарина, включающий 21 зону, мне удалось убедить Канна в том, что для макромолекул, склонных к комплексообразованию с амфолинами, скорее всего должно наблюдаться «мультиплетное» артефактное расщепление зон. Это связано с тем, что в образовании комплексов будут обязательно участвовать несколько компонентов смеси амфолитов-носителей, а не какой-то один компонент с определенным значением pI. Впоследствии эта точка зрения была принята (Cann, 1979). Помимо рассмотренных выше случаев артефактной гетерогенности следует упомянуть о существовании еще одной группы явлений этого типа. Имеются серьезные указания на то, что при фокусировании клеток животных амфолиты-носители активно связываются с поверхностью клеток, вероятно, за счет взаимодействия между

протонированными аминогруппами оснóвной цепи амфолитов и расположенными на поверхности остатками сиаловой кислоты (McGuire et al., 1980). Это явление будет более подробно рассмотрено в следующей главе (см. рис. 5.6).

За исключением отмеченных случаев возникновения артефактов, связанных с особенностями структуры некоторых классов макромолекул, практически нет данных, которые свидетельствовали бы о том, что подобное расщепление пиков может происходить в результате взаимодействия между амфолитами и белками. Даже выдвинутое на первых порах утверждение об образовании комплекса между амфолинами и фракцией кислых белков с низким содержанием серы (Frater, 1970) было в дальнейшем опровергнуто в работе Marshall, Blagrove, 1979, в которой было проведено вполне успешное изоэлектрическое фракционирование этих же белков. Пожалуй, единственный достоверный случай артефактного расщепления при ИЭФ белков был описан в работе Jonsson et al., 1978. Было установлено, что фосфопротеин из передних зубов крысы связывается с амфолинами и фокусируется в виде набора зон с кажущимися значениями pI в диапазоне pH 2,5—3,1, в то время как истинное значение его pI составляет 1,1. Само по себе это не столь неожиданно, поскольку по плотности отрицательного заряда такой кислый белок приближается к гепарину и соответственно ведет себя подобно полианиону. Не исключено, что аналогичным образом ведет себя и липопротеинлипаза (Bengtsson, Olivecrona, 1977). Тем не менее экспериментатору следует смириться с тем, что в подавляющем большинстве случаев гетерогенность, выявляемая с помощью ИЭФ, непосредственно отражает реальное состояние самого белкового препарата.

ГЛАВА 5

Некоторые применения метода ИЭФ

Опубликовано уже более 4000 работ, в которых описывается применение ИЭФ для решения целого ряда задач в области биологии, биохимии и генетики. Если вы рассчитываете найти здесь исчерпывающий обзор всех этих работ, то смею вас заверить — или вам попалась не та книга, или мне попался не тот читатель, или и то и другое вместе (впрочем, справедливости ради, не следует упускать из виду и еще одну возможность — книге не повезло с автором). В разд. 1.4 я перечислил основные книги и обзоры по ИЭФ, которые читателю, вероятно, придется просмотреть для того, чтобы отыскать сведения по интересующей его области применения метода. В настоящей главе вкратце будут рассмотрены лишь отдельные примеры приложения ИЭФ, свидетельствующие о том, сколь значительных успехов в изучении биохимических процессов удается достичь сегодня, грамотно используя широкие возможности этого метода. Некоторые из рассматриваемых примеров были выбраны для того, чтобы продемонстрировать, с какими подводными камнями и непреодолимыми препятствиями приходится сталкиваться при неправильной постановке задачи, связанной с использованием ИЭФ.

5.1. ИЭФ пептидов

Возможность использования ИЭФ для разделения пептидов особенно привлекательна ввиду свойственных этому методу высокой разрешающей способности и эффекта изоэлектрического концентрирования сфокусированных компонентов. Последнее обстоятельство весьма существенно для анализа сложных смесей пептидов — природных, синтетических или полученных в результате фрагментации крупных полипептидных цепей, поскольку пептиды в отличие от белков характеризуются достаточно высокими коэффициентами диффузии и при использовании традиционных методов фракционирования образуют, как правило, диффузные зоны. Однако наладить аналитическое ИЭФ

пептидов не удавалось из-за их близкого сходства с амфолитами-носителями по структуре и реакционной способности. Классические методы обнаружения пептидов (окрашивание нингидрином, обработка реактивом Фолина, микробиуретовая реакция, окисление перманганатом, иод-крахмальная реакция) на самом деле с тем же успехом могут быть использованы для детектирования сфокусированных амфолинов в геле. О первых попытках аналитического фокусирования пептидов сообщалось еще в 1973 г. (Kopwillem et al., 1973). С помощью ИЭФ в геле авторы анализировали активные фрагменты гормона роста человека, синтезированные твердофазным методом по Merrifield, 1969. Детектирование сфокусированных зон было основано на присутствии хромофора (динитрофенил-His) в полипептидных цепях. Ясно, что такой способ детектирования не может быть универсальным. В случае плохо растворимых в воде амфотерных антибиотиков ИЭФ проводилось в гелях, содержащих 50% ДМСО (Righetti, Righetti, 1974). После ИЭФ гель погружали в дистиллированную воду. При этом происходило быстрое вымывание ДМСО из геля и вслед за тем преципитация сфокусированных компонентов с образованием опалесцирующих зон, содержащих полностью активный материал, количественное определение которого достигалось сканированием при 600 нм. Конечно же, и этот метод может найти только ограниченное применение.

Переломным моментом в развитии метода можно считать 1978 г., когда были опубликованы работы Righetti, Chillemi, 1978, и Bibring, Baxandall, 1978, в которых независимо описывалось изоэлектрическое фракционирование пептидов в сочетании с регистрацией зон обычными методами белкового окрашивания. Как правило, использовался коллоидный раствор CBB G-250 (или R-250) в 12—15%-ной ТХУ. Краситель в мицеллах находится в лейкоформе (прозрачный коллоидный раствор CBB G-250 имеет бледно-зеленую окраску) и только после связывания с пептидом (или белком) приобретает голубой цвет. После фокусирования гель погружают непосредственно в раствор красителя. Амфолиты-носители выходят из геля, а пептиды, малорастворимые в 12—15%-ной ТХУ, дополнительно фиксируются за счет связывания молекул красителя, которые могут образовывать поперечные сшивки между цепями. Таким образом, по-видимому, формируются высокомолекулярные агрегаты, «застревающие» в полимерной пространственной сетке геля. При этом сама матрица остается неокрашенной, возможно, из-за того, что мицеллы красителя не способны проникнуть во внутреннее пространство геля. Поэтому отпадает необходимость в процедуре отмывания фона кислотно-спиртовым раствором (что могло бы вызвать, в частности, удаление

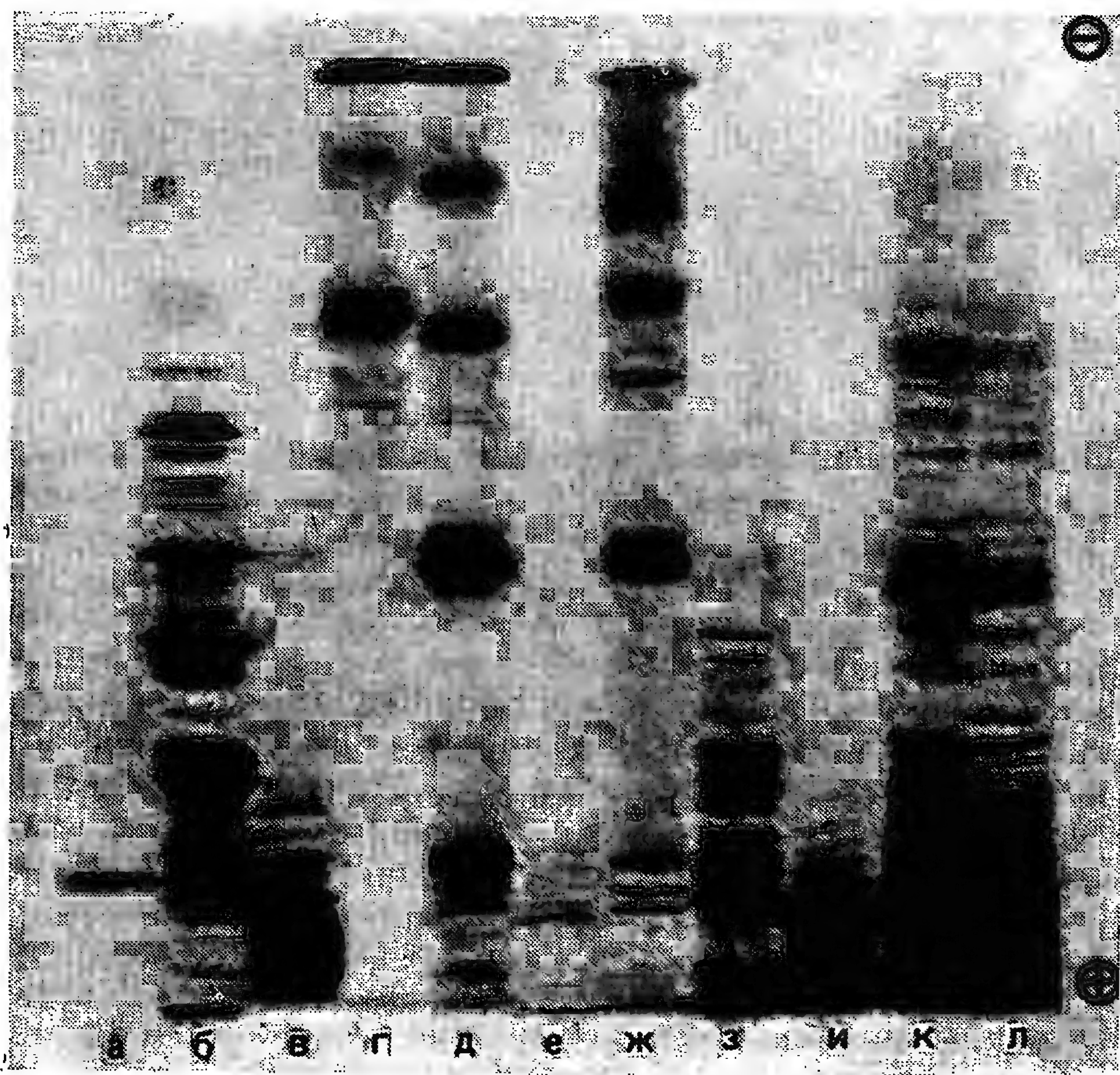


Рис. 5.1. ИЭФ пептидов, содержащих от 8 до 54 аминокислотных остатков, проводили в слое 7%-ного акриламидного геля толщиной 0,7 мм, содержащем 2%-ные амфолины pH 3,5—10 и 8 М мочевину. Образцы (10-15 мкл с концентрацией 10 мг/мл) наносили в виде смоченных соответствующими растворами кусочков фильтровальной бумаги вблизи анода после префокусирования в течение 1 ч. Полное время фокусирования — 4 ч при мощности 10 Вт (в равновесии напряжение составляло 1000 В). Гель окрашивали коллоидным раствором CBB G-250 в 12,5%-ной ТХУ. Образцы представляли собой следующие синтезированные фрагменты последовательности гормона роста человека: а — остатки с 31 по 44; б — с 15 по 36; в — со 111 по 134; г — с 1 по 24; д — со 166 по 191; е — с 25 по 51; ж — со 157 по 191; з — с 1 по 36; и — с 96 по 134; к — со 115 по 156 и л — со 103 по 156. Более короткие фрагменты (окта-, нона-, дека- и додекапептиды) в этих условиях не фиксировались и не окрашивались. (Righetti, Chillemi, 1978.)

связанного с пептидами красителя и солюбилизацию материала фиксированных пептидных зон). Данный метод позволяет зафиксировать и окрасить пептиды с минимальной длиной около 12—14 аминокислотных остатков, т. е. с M_r около 1500 (см. рис. 5.1). Адсорбции красителя способствует присутствие в структуре пептида остатков оснóвных аминокислот и относительно высокое содержание гидрофобных остатков. Краситель может взаи-

модействовать как с оснóвными группами, так и с (преимущественно близлежащими) боковыми цепями гидрофобных аминокислотных остатков. Возможный механизм фиксации пептидов на стадии окрашивания проиллюстрирован на рис. 5.2. (Righetti, Chillemi, 1978). Предполагается, что краситель связывается одновременно с двумя полипептидными цепями (через сульфо-

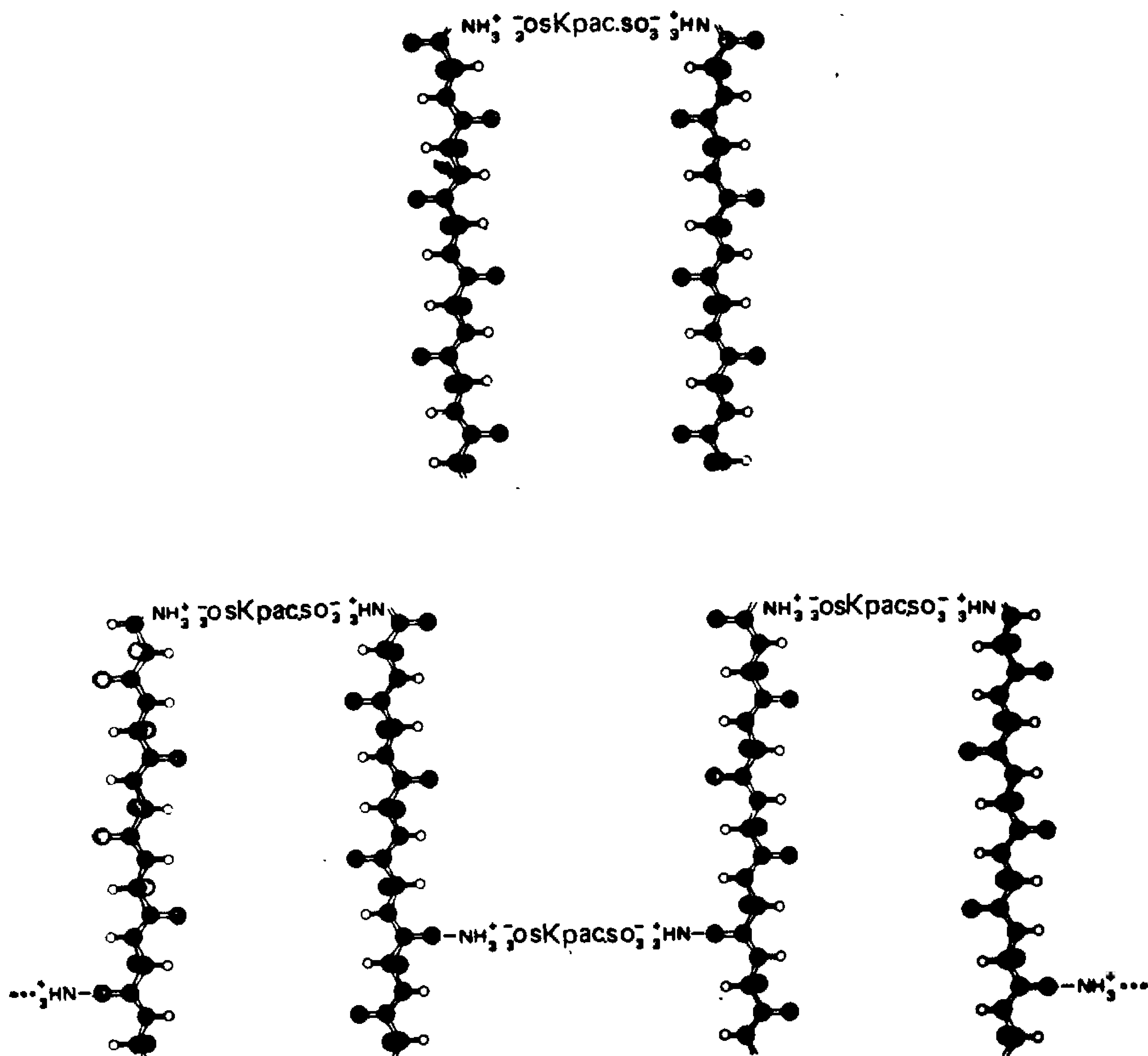


Рис. 5.2. Гипотетическая модель связывания пептидов с красителем. Пептиды, не содержащие оснóвных аминокислотных остатков (*вверху*), могут взаимодействовать с красителем только за счет N-концевых аминогрупп, образуя крайне нестабильные димерные комплексы, легко диссоциирующие в воде. В нижней части рисунка изображены пептидные цепи, имеющие дополнительный центр связывания (ε-аминогруппа лизина). В этом случае образуются макромолекулярные агрегаты, нерастворимые в воде и «застревающие» в порах матрицы геля. Данная модель предполагает не планарную (изображенную на рисунке), а пространственную упаковку полипептидных цепей. Агрегаты могут быть стабилизированы и благодаря стэкинг-взаимодействию между ароматическими кольцами различных остатков красителя, которые достаточно жестко фиксируются посредством ионных связей между двумя сульфогруппами каждой молекулы красителя и аминогруппами пептидных цепей. (Righetti, Chillemi, 1978.)

группы), что и приводит к образованию поперечных сшивок, агрегации и иммобилизации объемистых агрегатов в геле (условное обозначение красителя по Diezel et al., 1972).

Несмотря на то что вышеописанный метод позволяет сделать существенный шаг вперед в области пептидного анализа, его, к сожалению, не удается применить для детектирования представителей целого класса олигопептидов (от ди- до тетрадекапептидов), среди которых, как известно, есть немало биологически активных веществ. Отчасти этот пробел удается заполнить (Gianazza et al., 1979b) благодаря использованию ультратонких гелей, описанных в работе Görg et al., 1978. Олигопептиды фокусируют в слое ПААГ толщиной 300 мкм при высоком напряжении, позволяющем получить довольно узкие зоны. После ИЭФ гель накладывают на лист фильтровальной бумаги и немедленно высушивают в термостатируемом шкафу при 110 °С. Гель высыхает на бумаге в виде тончайшей пленки, которую можно опрыскивать любыми специфическими реагентами на остатки Arg, Met, Cys, Tyr, Trp или His, точно так же, как это делается при проявлении бумажных хроматограмм. Этим способом можно регистрировать в среднем около 30% всех аминокислотных остатков в олигопептидах, что позволяет достичь чувствительности на уровне нескольких микрограмм на сфокусированную пептидную зону. Независимо была предложена методика обнаружения сфокусированных пептидов по окрашиванию остатков His, но не в высушенном, а во влажном геле (Faupel, Von Arx, 1978). Есть основания полагать, что, используя вышеупомянутые методические подходы, можно получить полную пептидную карту, основываясь только на одномерном ИЭФ, что означает существенную экономию времени и материалов по сравнению с традиционным двумерным методом отпечатков пальцев (Gianazza, Righetti, 1979; Righetti et al., 1980c).

В качестве одного из последних достижений следует отметить предложенную недавно универсальную методику окрашивания зон, не зависящую от длины пептидной цепи. После ИЭФ высушенный ультратонкий гель обрабатывают парами иода в закрытом сосуде. Молекулы иода быстро адсорбируются амфолитами-носителями, создавая по всей поверхности геля, высушенного на бумаге, ровный коричневый фон. Сфокусированные пептиды по не вполне понятным причинам вызывают локальное ингибирование адсорбции иода и таким образом могут быть обнаружены в варианте негативного контрастирования — белые зоны на коричневом фоне. Поскольку прокрашивание не связано с какими-либо химическими превращениями, оно оказывается полностью обратимым. В то же время окраска может быть восстановлена при повторной обработке парами иода в течение нескольких минут. Для получения ровного, а не крапчатого ко-

ричневого фона содержание амфолинов в геле при ИЭФ повышают до 4% (против обычных 2%), с тем чтобы сгладить просветы между сфокусированными зонами индивидуальных амфолитов-носителей. Серьезным недостатком этого метода является его низкая чувствительностъ — содержание пептидов должно составлять не менее 30 мкг на зону. В то же время его удобно использовать в сочетании с полупрепаративным ИЭФ пептидов, которые удается затем элюировать из геля 80%-ной уксусной кислотой с выходом до 85% (рис. 5.3). Помимо рассмотренных выше способов делались попытки окрашивать сфокусированные пептиды обычным кислотно-спиртовым раствором кумасси после предварительной обработки 5%-ным формальдегидом (Stock et al., 1980). Однако такой метод едва ли можно считать удачным, поскольку он приводит к фиксации и окрашиванию как пептидов, так и амфолитов-носителей. В настоящее время ИЭФ стало весьма распространенным методом изучения пептидов, особенно при исследовании пептидных гормонов (Noble et al., 1977; Biscoglio De Jimenez Bonino et al., 1981; Schwartz et al., 1981; Kohnert et al., 1973).

Несмотря на успехи в области аналитического ИЭФ пептидов, осуществление фракционирования в препаративном варианте остается непростой задачей. Это обусловлено главным образом близостью амфолитов-носителей и пептидов как по мол. массе, так и по заряду. Данное обстоятельство крайне осложняет процесс разделения пептидов и амфолитов после ИЭФ с помощью гель-фильтрации, диализа или ионообменной хромато-

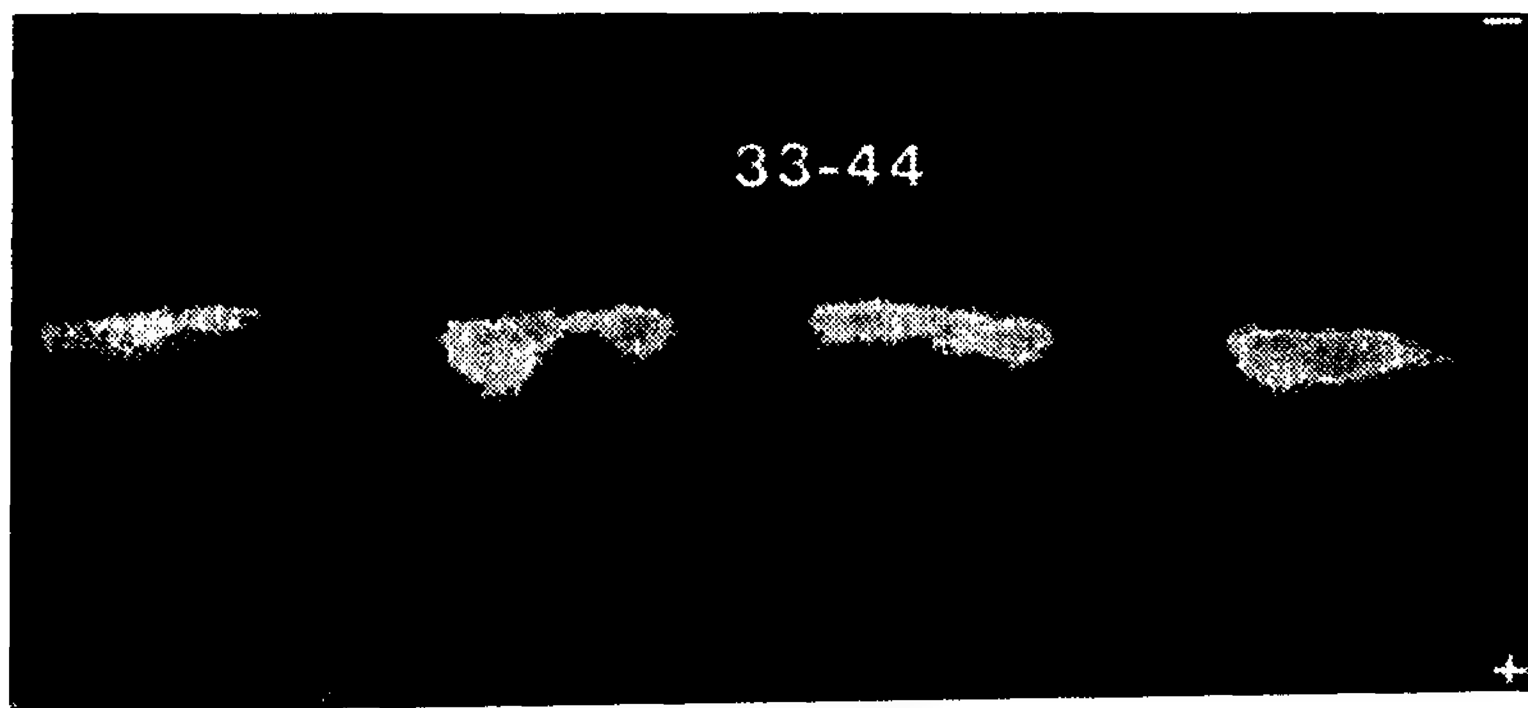


Рис. 5.3. ИЭФ фрагмента последовательности 33—44 гормона роста человека (hGH) в пластине ПААГ (150 мкг белка на зону). Зоны проявляли с помощью кратковременной (несколько секунд) обработки геля парами иода. После обработки гель обдували воздухом до обесцвечивания фона, зоны вырезали, пептид элюировали 80%-ной уксусной кислотой, а затем проводили солянокислый гидролиз и автоматический аминокислотный анализ гидролизата. (Gianazza et al., 1980b.)

графии. Хотя мол. масса амфолитов-носителей, как правило, не превышает 1000, склонность к агрегации в растворе (Bianchi Bosisio et al., 1981) препятствует их отделению даже от значительно более высокомолекулярных пептидов. Недавно были исследованы возможности разделения амфолитов-носителей и пептидов с помощью гидрофобной хроматографии на октил-сефарозе (Gelsema et al., 1980b). Впрочем, не следует рассчитывать на то, что этот метод может решить проблему полностью, хотя бы потому, что пептиды с $M_r<5000$, как правило, не связываются с гидрофобными сорбентами (Hjertén, 1974). Это согласуется и с выводами, к которым приходят авторы вышеупомянутого исследования: «С помощью гидрофобной хроматографии в присутствии соли, как правило, не удается разделить амфолиты-носители и пептиды с молекулярной массой в наиболее важном диапазоне (скажем, от 2000 до 8000)».

В качестве другого подхода к решению этой задачи можно было бы использовать ИЭФ пептидов в присутствии сравнительно низкомолекулярных амфолитов-носителей (для амфолинов среднее значение $M_r=750$). Синтез таких низкомолекулярных амфолитов (среднее значение $M_r=300$) был описан в работе Gasparic, Rosengren, 1975. Однако эти амфолиты никогда не применялись собственно для фракционирования пептидов, а кроме того, в настоящее время они не поступают в продажу. В работе Righetti, Hjertén, 1981, была сделана попытка подойти к решению этой же задачи с другой стороны, т. е. вместо того чтобы уменьшать молекулярную массу амфолитов, авторы предприняли синтез необычно высокомолекулярных амфолитов-носителей (см. также разд. 1.7.4). Раствор высокомолекулярного полиэтиленимина (M_r 40 000—60 000) смешивали в проточном реакторе с линейным градиентом акриловой кислоты и проводили синтез при 80 °C в течение 70 ч. Таким образом удалось получать гигантские амфолиты-носители с M_r в диапазоне 50 000—90 000. Несмотря на то что эти амфолиты весьма склонны к агрегации и преципитации, особенно в кислом диапазоне pH, с белками они связываются непрочно и обратимо. Не было обнаружено никакого взаимодействия с модельными дипептидами (His-Ser, His-Met, His-Phe и His-Lys), которые при препаративном фракционировании удавалось получать с выходами около 85%.

Все эти данные указывают на то, что, несмотря на определенные трудности, имеются реальные возможности для осуществления как аналитического, так и препаративного ИЭФ пептидов. Можно полагать, что и эти трудности удастся полностью преодолеть с помощью разработанного недавно метода фокусирования в иммобилизованном градиенте pH (система Immobiline, производство фирмы LKB).

Последние данные, полученные нашей группой (Gianazza, Righetti, неопубликованные результаты), свидетельствуют о том, что сфокусированные пептидные зоны в этом случае можно проявлять с помощью опрыскивания нингидрином, флюорескамином или любым другим реагентом на первичную аминогруппу, поскольку иммобилизованные буферные компоненты с этими реагентами не взаимодействуют. С точки зрения препаративного фракционирования метод иммобилизованных градиентов pH удобен тем, что он допускает внесение значительных количеств образца и позволяет выделить сфокусированные пептиды без примесей буферных компонентов, которые ковалентно пришиты к матрице. Можно не сомневаться, что применение этого нового метода позволит добиться значительных успехов в области химии пептидов.

5.2. ИЭФ клеток, субклеточных частиц, бактерий и вирусов

Впервые ИЭФ клеток было осуществлено в работах Sherbet et al., 1972, и Sherbet, Laksmi, 1973, с использованием стационарного линейного градиента концентрации сахарозы (10—55%), глицерина (10—70%) или фиколла (5—30%), содержащего 1%-ные амфолины, в стандартной колонке фирмы LKB объемом 110 мл. Процесс ИЭФ клеток в этих условиях занимал около 30 ч. Впоследствии был предложен метод проточного изоэлектрического фракционирования клеток (Just et al., 1975a,b; Just, Werner, 1977a,b). ИЭФ проводили в модифицированном аппарате Ханнига, и время пребывания клеток в проточной камере аппарата составляло всего лишь 7—10 мин. О фокусировании клеток сообщалось и в некоторых других публикациях. В работе Leise, Le Sane, 1974, разделение лимфоцитов периферической крови человека и кролика осуществляли с помощью ИЭФ в градиенте декстрана-40, а в работе Hirsch, Gray, 1976, ИЭФ лимфоцитов периферической крови крысы проводили в декстрановом градиенте, приготовленном на изотоническом сахарозном растворе. Сообщалось об изоэлектрическом фракционировании фибробластов китайского хомячка в линейном градиенте фиколла, изотонические свойства которого по всему объему поддерживались с помощью сахарозы и глюкозы (Boltz et al., 1977). С помощью ИЭФ в фиколл-сахарозном градиенте анализировали клетки асцитной опухоли Эрлиха и гепатоциты у крыс (Manske et al., 1977). В градиенте фиколла проводилось даже выделение кабаньих (Moore, Hibbit, 1975) и кроличьих сперматозоидов (Hammerstedt et al., 1979).

В работах Sherbet, 1978, и Langton et al., 1975, сообщалось об ИЭФ бактерий. Согласно данным Talbot, 1975; Mandel, 1971; Chlumechka et al., 1973, и Rice, Horst, 1972, ИЭФ может быть использовано и для фракционирования вирусов.

Таблица 5.1. Равновесный изоэлектрический анализ клеток *E. coli* после обработки различными способами[1]

Способ обработки клеток	Наблюдаемое значение pI	Ионогенные группы в изоэлектрической зоне[2]		Расчетное значение pI[3]	Число чистых зарядов на клетку ($\cdot 10^{-6}$)[4]
		вероятно, присутствуют	не берутся в расчет		
Контроль (необработанные клетки *E. coli*)	5,60±0,10	$-COOH$; $-NH_2$ (pK=7,5)	Кислые группы с pK<3,2; ε-аминогруппы лизина	5,38	−0,37
Кислота (отмывка)/этиленимин	8,55±0,04	$-NH_2$ (pK=7,5)	Аминогруппы фосфолипидов; фенольные гидроксилы; гуанидиновые группы	8,7	+0,41
Формальдегид	3,85±0,06	$-COOH$[5]	Кислые группы с pK<3,2	3,5	−0,84
6,6′-дитиодиникотиновая кислота	4,28±0,05	$-COOH$; $-NH_2$(pK=7,5)	Меркаптогруппы[6]		
Кислота (отмывка)/этиленимин/6,6′-дитиодиникотиновая кислота	7,47±0,18	$-NH_2$ (pK=7,5)	Меркаптогруппы[6]		

[1]) Все данные — по Sherbet, Lakshmi, 1975.

[2]) Считается, что в число групп, определяющих изоэлектрические свойства клеток, входят группы, удаленные от поверхности на глубину до 6,0 нм.

[3]) Значения pI рассчитаны на основании данных о pK ионогенных групп, скорректированных с помощью уравнения Хартли — Рои: $pI = -\log(\Sigma k'_a \cdot k'_w / \Sigma k'_b)^{1/2}$, где k'_a и k'_b — скорректированные константы диссоциации наиболее сильных анионогенных и катионогенных групп соответственно, а $k'_w = 6,81 \cdot 10^{-15}$ при 20 °С.

[4]) Результирующее число отрицательных зарядов на поверхности клетки (Q) рассчитано по формуле $Q = PDr^2K \cdot 3,3 \cdot 10^{-3}/e$ (Sherbet et al., 1972). Величина поверхностного потенциала P оценивается как разность потенциалов между раствором при нейтральном pH и раствором при pH, равном pI клеточной поверхности, и определяется выражением $(7 - pI) \cdot 2,303RT/F$, где R — универсальная газовая постоянная (8,315 Дж/К·моль), T — абсолютная температура (в К), F — постоянная Фарадея (96 500 Кл/моль). При 25 °С значение выражения $2,303RT/F = 0,592$. D — диэлектрическая постоянная воды (равная 78,54 при 25 °С); r — радиус клетки (в см); K — функция Дебая — Хюккеля ($0,327 \cdot 10^8 I^{1/2}$ при 25 °С), где I — ионная концентрация амфолитов (для амфолинов в этих условиях она полагается равной 0,01 M); e — заряд электрона ($1,6 \cdot 10^{-19}$ Кл).

[5]) Карбоксильные группы глюкуроновой и нейраминовой кислот, β-COOH аспарагиновой кислоты, γ-COOH глутаминовой кислоты.

[6]) Число меркаптогрупп на поверхности клеток соответствует числу отрицательных зарядов, введенных при реакции с 6,6′-дитиодиникотиновой кислотой (около $0,35 \cdot 10^6$ групп). При физиологических значениях pH лишь небольшая доля этих групп (менее 3%) находится в диссоциированной форме.

Таблица 5.2. Значения pI клеток животных, бактерий и вирусов, определенные методом изоэлектрического равновесия[1]

Объект	pI	Литературный источник
Hela, карцинома шейки матки	6,85	
Hela, обработанные γ-глобулинами	6,36	
Асцитная саркома Иосиды	6,35	Sherbet et al., 1972[2]
Асцитная опухоль Эрлиха	5,6	
Клетки Ру	6,4	
Нормальные клетки печени	6,5	
Гепатома крысы	6,75	Sherbet, Lakshmi (не опубл.)[2]
Мышиные фибробласты 3Т3	4,6	Sherbet, Lakshmi (не опубл.)[3]
Клетки SV-3T3	4,8	
SV-CHK	4,66	Sherbet, Lakshmi, 1976[3]
SV-TRK	4,6	
Py-3T3	4,78	
Астроцитома человека		
I поколение	5,15	
II поколение	5,0	
III и IV поколения	4,48	Sherbet, Lakshmi, 1974[3]
Менингиома человека	4,73	
Клетки мозга эмбриона человека	4,38	
Escherichia coli	5,6	Sherbet, Lakshmi, 1973, 1975[2]
Эритроциты человека	5,6	
Эритроциты мыши	5,8	Just et al., 1975
Эритроциты кролика	6,0	
Сперматозоиды кабана	6,5	Moore, Hibbit, 1975
Вирус желтой мозаики репы	4,0	
Вирус хлоротической крапчатости вигны китайской	4,1	
Бактериофаг Qβ	4,1	Rice, Horst, 1972[4]
Помощник вируса некроза табака	4,3	
Вирус мозаики костра	6,8	
Поксвирусы	4,0	Hill et al., 1963[5]
Вирус ящура	6,9 и 4,3	Talbot, 1975

[1]) Все данные в таблице (кроме последней строки) взяты из книги Sherbet, 1978.
[2]) pI определяли при 25 °С в 0,008 М растворе амфолинов.
[3]) pI определяли в 0,009 М растворе амфолинов.
[4]) pI определяли в 2%-ном растворе амфолинов.
[5]) pI определяли электрофоретически.

В фундаментальном исследовании, посвященном электрофорезу и ИЭФ клеток (Sherbet, 1978), показано, что ИЭФ можно использовать для измерения плотности поверхностного заряда клеток, для определения значений рK ионизирующихся групп на клеточной мембране, а также для контроля за химической модификацией заряженных групп клеточной оболочки (табл. 5.1). По данным Sherbet, 1978, с помощью ИЭФ можно добиться

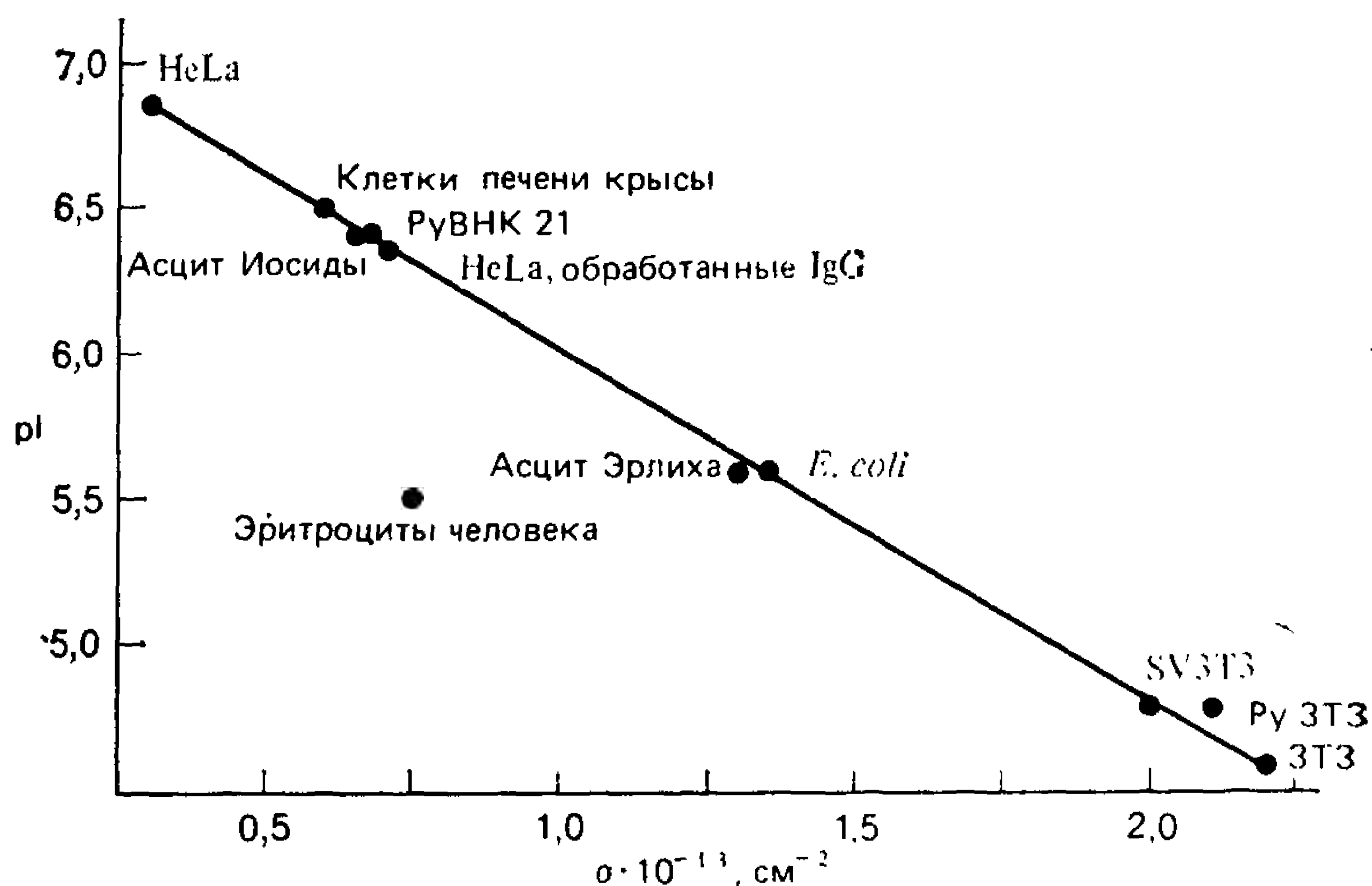


Рис. 5.4. Зависимость значений pI, определенных с помощью ИЭФ, от поверхностной плотности заряда клеток. Обратите внимание на четкую линейную корреляцию указанных величин для всех исследованных клеточных линий, за исключением эритроцитов. График построен по данным работы Sherbet, 1978. (Righetti et al., 1980.)

значительно более глубокого электрокинетического зондирования клеточной поверхности, чем при обычном зональном электрофорезе. Так, если на подвижности клеток при обычном электрофорезе сказывается вклад ионогенных групп, расположенных на глубине до 1,4 нм от поверхности, то при ИЭФ тестируемая глубина может быть по крайней мере в 5 раз больше, т. е достигать 6—7 нм. Кроме того, используя определенные с помощью ИЭФ значения pI клеток, можно рассчитать поверхностную плотность заряда (σ), а также электрофоретическую подвижность (перечень значений pI различных клеток приведен в табл. 5.2). В свою очередь можно провести линейную корреляцию между плотностью зарядов (числом зарядов на 1 см^2 клеточной поверхности) и электрокинетическим потенциалом (ζ-потенциалом) в том случае, если последний не превышает 27 мВ. Исходя из этого, я попытался графически оценить точность полученных Шербетом данных. Как видно из рис. 5.4, налицо достаточно хорошая корреляция между значениями pI и поверхностной плотностью заряда для 11 клеточных линий животных. Для 10 клеточных линий со значениями pI в диапазоне 4,5—7,0 соответствующие точки почти идеально ложатся на прямую (декремент σ составляет около $0,85 \cdot 10^{-13} \cdot см^{-2}$ на одну единицу pH). Сильное отклонение от линейной зависимости наблюдается только в случае эритроцитов человека. Судя по графику,

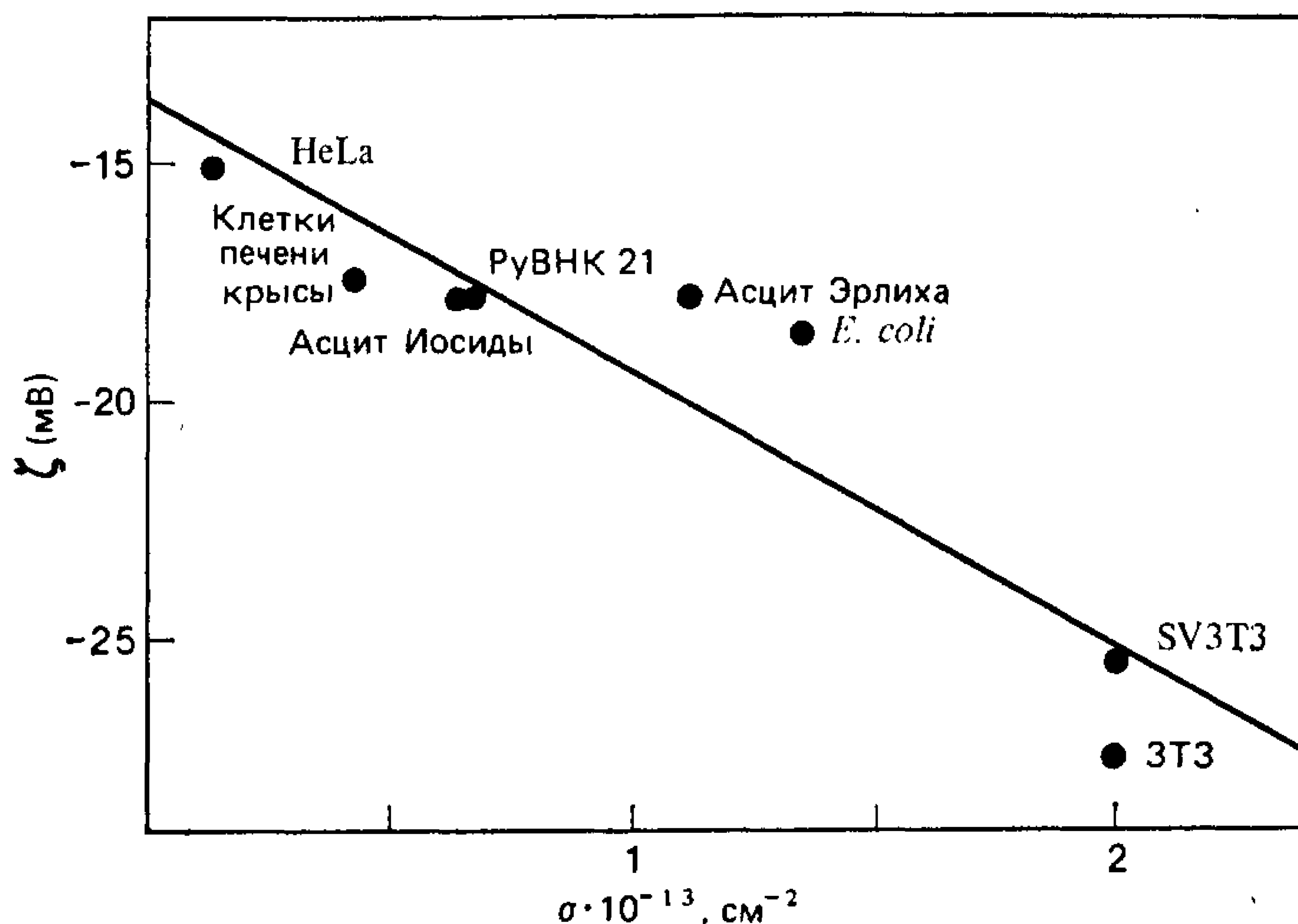


Рис. 5.5. Зависимость электрокинетического потенциала (ζ-потенциала) различных клеточных линий от поверхностной плотности заряда. График построен по данным работы Sherbet, 1978. (Righetti et al., 1980.)

плотность заряда у клеток с pI 5,5 (это значение приведено в работе Just et al., 1975a) должна быть вдвое выше. Если же исходить из значения σ, то изоточка эритроцитов должна быть около 6,3. Эритроциты — это, вероятно, наиболее полно изученные клетки млекопитающих, поэтому наблюдаемое для них отклонение от общей линейной зависимости весьма подозрительно. При построении зависимости ζ-потенциала от плотности заряда опять-таки наблюдается линейность (рис. 5.5), однако с большим разбросом точек (около половины всех точек заметно отклоняется от прямой).

И все же, несмотря на значительное число экспериментальных данных, процесс ИЭФ клеток нельзя считать полностью отработанным. Так, по данным Castimpoolas, Griffith, 1977, при ИЭФ лимфоцитов из селезенки мыши сфокусированные зоны быстро дефокусируются, а клетки в конце концов лизируют. Авторы предполагают, что попадание клеток в изоэлектрическую область стимулирует процессы перестройки в их мембранах, которые приводят к смещению эффективного значения pI клеток в более кислую область, что в свою очередь заставляет их мигрировать по направлению к зоне этого нового значения pI (т. е. дефокусироваться). Это может повториться несколько раз, до тех пор пока очередная мембранная перестройка не окажется столь серьезной, что вызовет лизис клеток. В самом деле, несмотря на многочисленные заверения в том, что клетки после ИЭФ сохраняют жизнеспособность (до 90% в опытах, ос-

нованных на вытеснении красителя; см. работы Hirsch, Gray, 1976; Manske et al., 1977), оказывается, что реальная жизнеспособность клеток, тестируемая по эффективности посева, как правило, достаточно низка (Boltz et al., 1977). В работе Longton et al., 1974, показано, что клетки, рекультивированные после ИЭФ, в течение длительного времени оказываются неспособными к размножению. Эти наблюдения привели к распространению предположения о том, что амфолиты-носители в некоторой степени цитотоксичны. Таким образом, следует критически проанализировать проблему мембранной стабильности и соответственно жизнеспособность клеток в условиях ИЭФ. Открытым остается пока и вопрос о том, соответствует ли эффективное значение pI, определяемое при ИЭФ клеток, «истинному» изоэлектрическому равновесию между положительно и отрицательно заряженными группами клеточной поверхности. Например, значение pI=5,6 клеток *E. coli* (Sherbet, 1978) практически совпадает с pI эритроцитов (см. рис. 5.4). В то же время отношение суммарного отрицательного заряда к положительному для *E. coli* составляет 2 : 1 ($2{,}899 \cdot 10^{-13}$ $см^{-2}$ отрицательно заряженных карбоксильных групп на $1{,}433 \cdot 10^{-13}$ $см^{-2}$ положительно заряженных групп), а для эритроцитов — 25 : 1 (Seaman, 1975), т. е. несравнимо больше. Трудно представить себе, чтобы эти два вида клеток характеризовались одинаковыми значениями pI.

Помимо всего прочего следует учитывать еще три обстоятельства, которые также могут отрицательно сказаться на достоверности данных, полученных при ИЭФ клеток. А именно: (а) после достижения равновесия в системе сфокусированные амфолиты-носители образуют среду с очень низкой ионной силой: по последним данным, в диапазоне 0,5—1 мг-ион/л для 1%-ных амфолинов (Righetti, 1980); (б) используемые при ИЭФ амфолиты способны хелатировать двухвалентные катионы металлов (Galante et al., 1975); (в) амфолиты-носители склонны к образованию комплексов с полианионами типа нуклеиновых кислот (Galante et al., 1976), сульфированных и карбоксилированных полисахаридов (Righetti, Gianazza, 1978; Gianazza, Righetti, 1978), а также с полипептидами типа полиглутамата или полиаспартата. В связи с этим следует отметить полученные недавно результаты, выявляющие pH-зависимый характер связывания амфолитов-носителей с поверхностью эритроцитов (McGuire et al., 1980). При pH 4 наблюдается прочное связывание; при pH 5 амфолиты связываются значительно слабее, а при pH 6 практически не связываются с клетками. Аналогичное поведение отмечено и для ПЭГА — полиамина, фактически представляющего собой основную (некарбоксилированную) цепь типичных амфолитов-носителей. На основании подобных резуль-

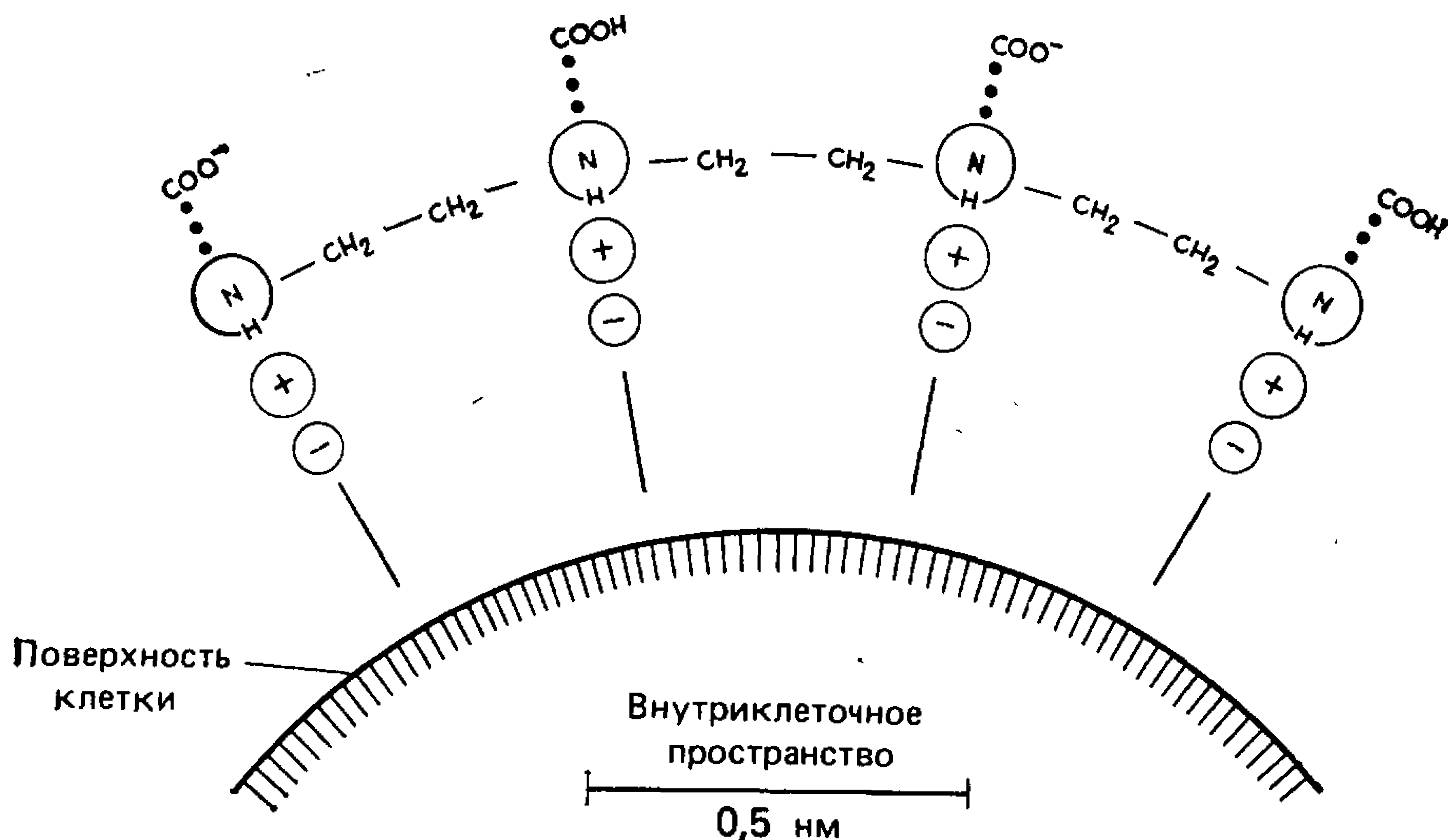


Рис. 5.6. Гипотетическая модель взаимодействия амфолинов с клеточной поверхностью. Сегмент молекулы одного из амфолинов представлен четырьмя протонированными атомами азота основной цепи, которые образуют ионные связи с четырьмя отрицательно заряженными группами на клеточной поверхности (возможно, с остатками сиаловой кислоты). Изображенные на схеме карбоксильные группы амфолита ориентированы по направленню от клеточной мембраны. При pH 4 эти слабые карбоксильные группы (p*K* в среднем около 4) окажутся протонированы примерно на 50%. Для наглядности кривизна изображенного участка поверхности сильно преувеличена. В действительности такой небольшой участок (протяженностью всего лишь около 1 нм) можно считать практически плоским. (Mc Guire et al., 1980.)

татов в работе McGuire et al., 1980, была предложена модель связывания амфолитов с клеточной поверхностью. На рис. 5.6 показан сегмент амфолиновой цепи, в которой четыре расположенных по цепочке атома азота (отделенных друг от друга диметиленовыми звеньями) образуют ионные связи с четырьмя отрицательно заряженными группами поверхности (вероятно, с остатками сиаловой кислоты, а также с сульфогруппами, связанными с боковыми цепями углеводов). Связывание амфолинов может изменять поверхностный заряд клеток и, таким образом, отрицательно сказываться на их стабильности и жизнеспособности. И в самом деле, уже в ранних работах группы Шербета (Sherbet, 1978) было обнаружено, что все виды клеток, фокусирующихся при pH около 5 (асцит Иосиды, асцит Эрлиха, клетки Ру, клетки HeLa, нормальные клетки печени — pI 4,70—5.30), т. е. в области, где связывание амфолинов еще ощутимо, после ИЭФ оказываются нежизнеспособными. Эти наблюдения подтверждаются и данными Hammerstedt., 1979. Авторы установи-

ли, что $pI_{каж}$ сперматозоидов остается неизменным, если клетки вносят в колонку с предварительно сфокусированным градиентом на участках с pH 7 или 8, но снижается на целых 2 ед. pH при внесении их в более кислую область градиента. Это явление можно объяснить или интенсивным связыванием кислых амфолитов-носителей с клетками, или повреждением поверхности в кислой области, или десорбцией осно́вных белков, связанных с углеводами на поверхности головки сперматозоида. В то же время связывание амфолинов скорее всего должно сопровождаться повышением, а не понижением pI, что, вероятно, и проявляется в достаточно высоких наблюдаемых значениях $pI_{каж}$ для многих клеток в диапазоне pH 6,0—6,8. С другой стороны, при фокусировании в цитратном буфере для большей части клеток наблюдаемые значения pI попадают в диапазон 3,5—4,7 (Boltz et al., 1978). Следовало бы провести дальнейшее исследование возможностей применения этого варианта ИЭФ, поскольку в присутствии цитрата заметно возрастает ионная сила среды, что препятствует агрегации клеток. Кроме того, сам цитрат, будучи олигоанионом, не должен связываться с клеточной поверхностью (Pittz et al., 1977). Предлагалось также проводить ИЭФ клеток в присутствии «плохих» цвиттерионов, таких, как глицин, таурин или триметиламинопропансульфокислота, которые способствуют поддержанию постоянной осмолярности на данном участке градиента pH (McGuire et al., 1980).

Итак, в свете рассмотренных противоречивых данных можно отметить, что к процессам разделения и характеристики клеток с помощью ИЭФ следует подходить с большой осторожностью. Нельзя исключить, что недостатки и ограничения, свойственные этому методу, в конце концов перевесят его возможные достоинства.

5.3. ИЭФ ферритинов

Ферритин — повсеместно распространенный белок; в этой форме запасается железо во всех тканях млекопитающих. В богатых железом тканях, таких, как печень, селезенка и ретикулоэндотелиальная система, ферритин содержится в значительном количестве, а в сердце и почках его уровень существенно ниже. В небольших, но ощутимых количествах ферритин содержится и в сыворотке (Drysdale, 1977b).

Ферритин состоит из белковой оболочки (апоферритина) и ядра, образованного преципитатом гидроксида железа (III). Белковая часть, имеющая форму полой сферы, характеризуется значением $M_r = 450\,000$. Ее наружный диаметр равен 12 нм, а диаметр центральной полости — 7 нм (Hoare et al., 1975). Железосодержащее ядро полностью изоли-

ровано от окружающего пространства и поэтому никак не сказывается на электрофоретических и иммунологических свойствах ферритина (Harrison et al., 1974). Белок состоит из 24 субъединиц, которые раньше считали идентичными по массе (M_r 19 000) и структуре (Bryce, Crichton, 1971). Недавно с помощью двумерного ИЭФ-электрофореза в ДДС-Na было показано, что субъединицы неодинаковы по размеру и, вероятно, несколько различаются по аминокислотному составу (Drysdale, 1977; Arosio et al., 1978b). Рентгеноструктурный анализ показал, что внутренняя полость соединяется с поверхностью шестью каналами. Каждый из этих каналов имеет максимальную ширину 1,6 нм, а минимальную — 0,7 нм (Banyard et al., 1978). Ферритин проявляет также каталитические свойства типа оксидоредуктазных — он адсорбирует и окисляет ионы железа (Stefanini et al., 1976; Melino et al., 1978). Внутренняя полость ферритина может совсем не содержать железа, а может включать его до 4000 атомов (Niitsu, Listowsky, 1973). Белок проявляет заметную гетерогенность по размеру из-за склонности к агрегации с образованием димеров, тримеров и более высокомолекулярных олигомеров, которые удается легко разделить с помощью гель-фильтрации или электрофореза (Suran, Tarver, 1975; Righetti et al., 1971).

Изоэлектрический анализ сыграл заметную роль в формировании современных представлений о структуре и функциях тканевых ферритинов. Именно с помощью ИЭФ для всех ферритинов была выявлена микрогетерогенность, отражающая тот факт, что любой ферритин представляет собой семейство близких изоформ с незначительно различающимися изоточками (Drysdale, 1974). Установлено, что число зон и их распределение при ИЭФ ферритинов тканеспецифичны. Как видно из рис. 5.7, наиболее кислым и наименее гетерогенным является ферритин клеток HeLa, наиболее оснóвным — ферритин из печени. Такая микрогетерогенность не связана со степенью насыщения железом и не является артефактом ИЭФ, поскольку при повторном фокусировании индивидуальных зон не происходит изменения их местоположения (Urushizaki et al., 1971; Ishitani et al., 1975). В действительности гетерогенность определяется реальными структурными различиями. Удалось показать, что все проанализированные множественные формы ферритина состоят из двух видов субъединиц, соотношение между которыми в целом белке зависит от типа ткани и связано с общим содержанием ферритина в ткани данного типа (Arosio et al., 1978). Была предложена модель, описывающая процесс образования изоферритинов с различным относительным содержанием субъединиц двух видов: легких L-субъединиц (M_r 19 000) и тяжелых H-субъединиц (M_r 21 000). Как показано на рис. 5.8, формы с ми-

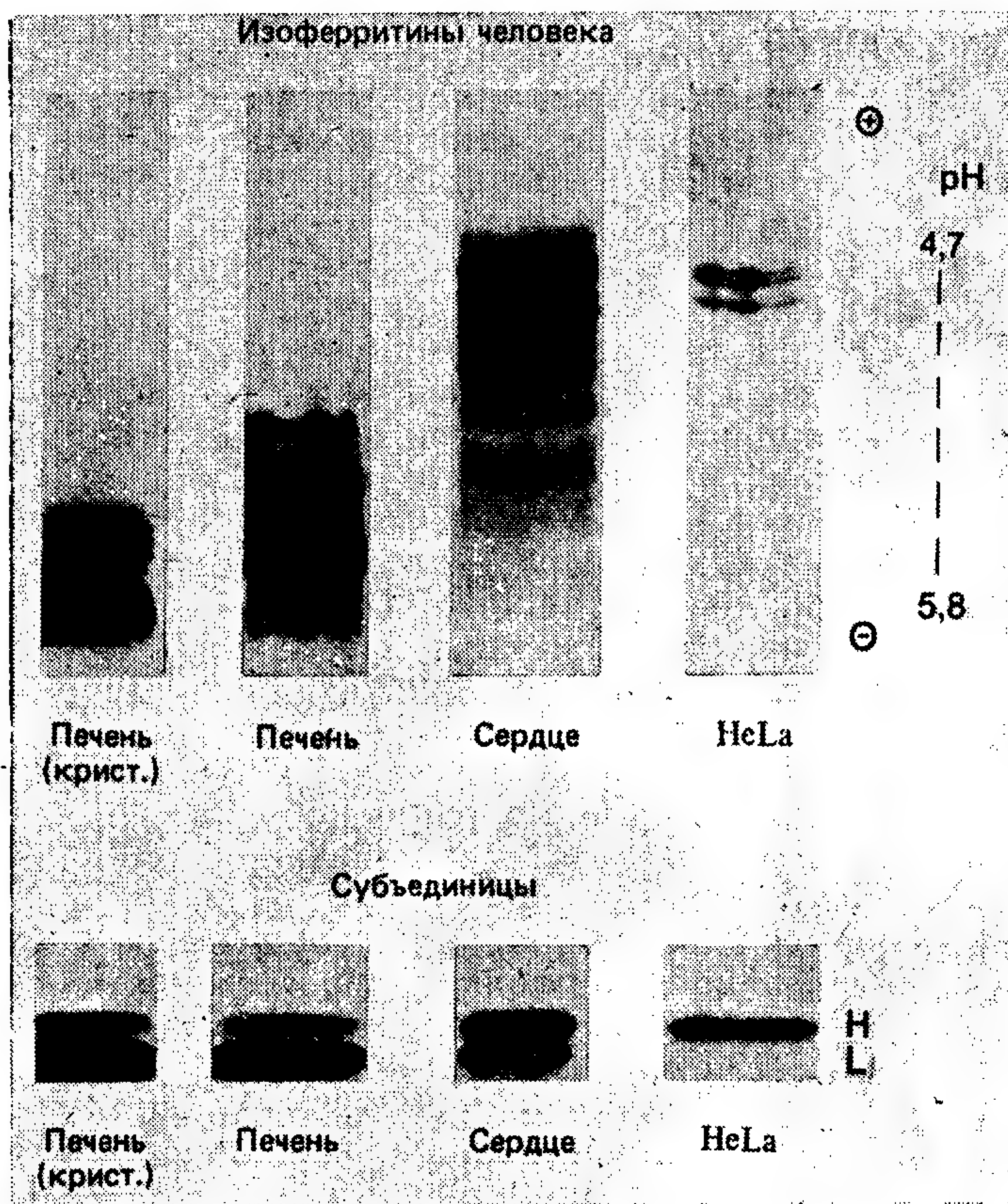


Рис. 5.7. Профиль ИЭФ изоферритинов из печени, сердца и клеток HeLa. Нижняя часть рисунка иллюстрирует относительное содержание субъединиц (H — тяжелых и L — легких) в изоферритинах из соответствующих тканей, оцениваемое с помощью электрофореза в ДДС-Na (Drysdale, 1977b.)

нимальными значениями pI (pI~4,6; например, ферритин из клеток HeLa) состоят в основном из H-субъединиц, а с максимальными (pI~5,7; например, чистый апоферритин или сывороточный ферритин) — в основном из L-субъединиц (Drysdale, 1977b; Arosio., 1978). H- и L- субъединицы, вероятно, отличаются друг от друга и по иммунологическим свойствам, поскольку антитела, полученные к ферритинам H-типа, дают лишь очень слабую перекрестную реакцию с формами, обогащенными L-субъединицами (Arosio et al., 1976). Судя по всему, разные изоферритины характеризуются различными физиологическими функциями. По данным Wagstaff et al., 1978, кислые (богатые H-субъединицами) ферритины быстрее связывают желе-

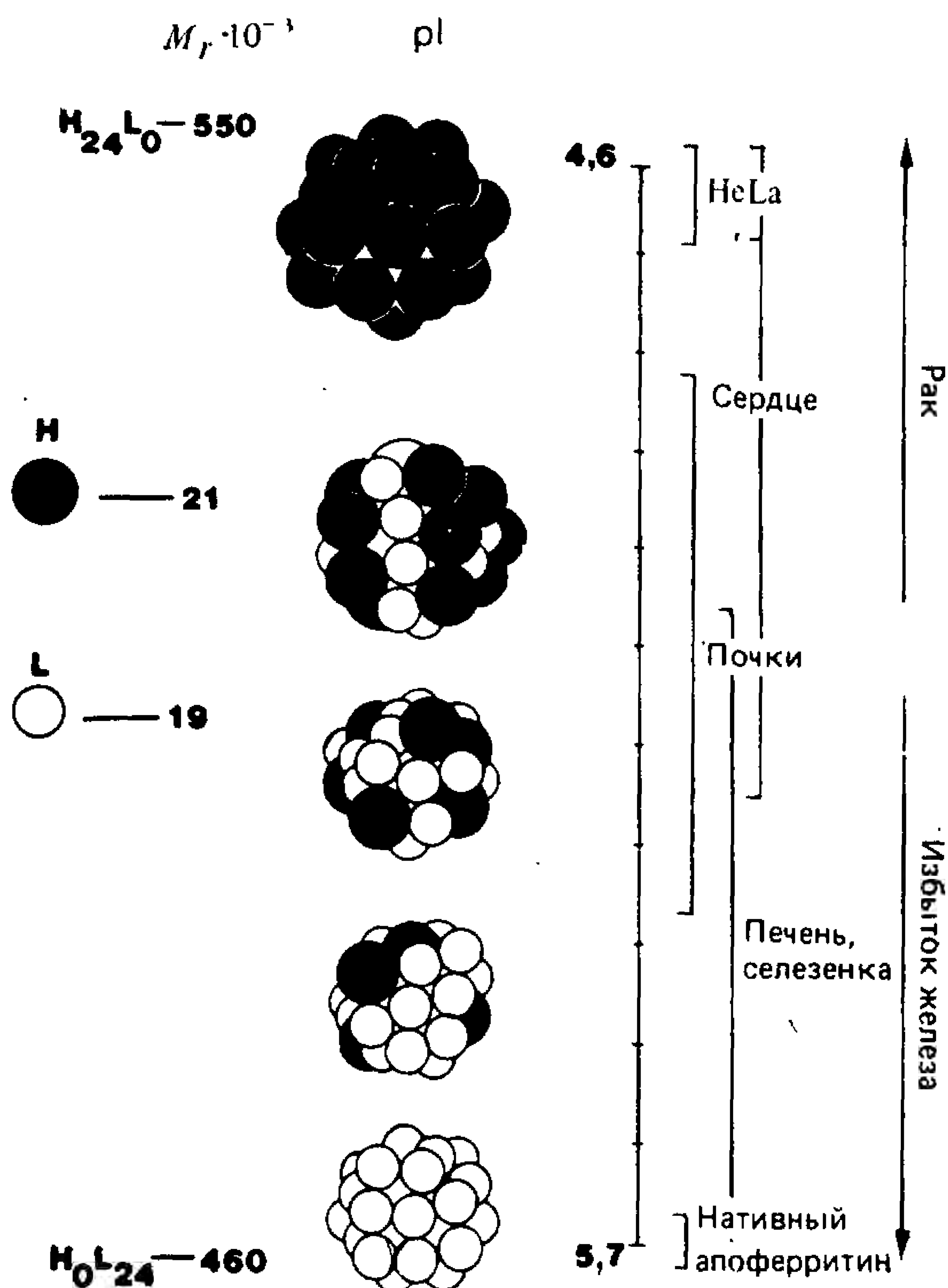


Рис. 5.8. Субъединичное строение изоферритинов и типичное распределение их по различным тканям. В состав белка в различных количественных соотношениях входят субъединицы двух типов — H (тяжелые) и L (легкие). Для наглядности различия в размере альтернативных мультимерных структур преувеличены. (Drysdale et al., 1977b.)

зо, чем более оснóвные ферритины (богатые L-субъединицами) (см. рис. 5.9). Кроме того, обнаружено, что при повышенном содержании железа, как правило, наблюдается повышение уровня ферритинов L-типа, в то же время при опухолях или недостаточности железа преобладают ферритины H-типа (Drysdale, 1979).

Сывороточному ферритину, открытому сравнительно недавно с помощью радиоиммунологического метода (Addison et al., 1972), придают сегодня важное клиническое и диагностическое значение. По структуре этот белок близок к тканевым ферритинам, а характер набора множественных форм, обнаруживаемых с помощью ИЭФ, как оказалось, может быть связан с изменениями при различных патологических состояниях. Некото-

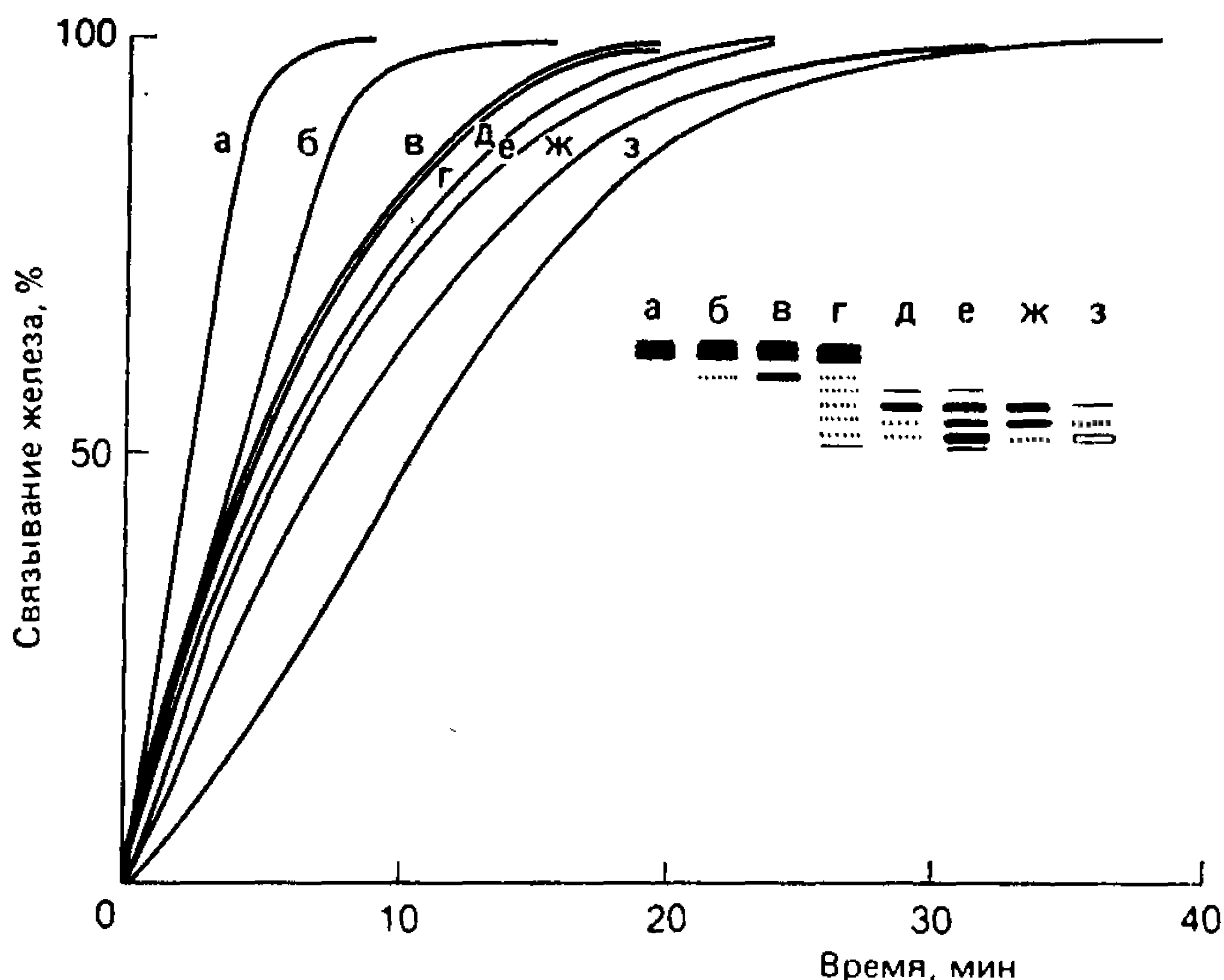


Рис. 5.9. Кривые связывания железа для различных апоферритинов человека. На рисунке приведены также соответствующие профили ИЭФ ферритинов из разных тканей. Наиболее кислые и наиболее богатые Н-субъединицами изоферритины (а—г) отличаются также наиболее высокой скоростью связывания железа. (Wagstaff et al., 1978.)

рые небольшие, но важные структурно-функциональные отличия сывороточного ферритина от тканевых ферритинов указывают на то, что сывороточный белок может иметь иное происхождение и заметно отличаться по своим физиологическим функциям. Речь идет о следующих его особенностях. а. Пониженное содержание железа — около 5% в отличие от примерно 20% для обычных тканевых ферритинов. Это указывает на сходство сывороточного ферритина с чистым апоферритином (Arosio et al., 1977) (см. также рис. 5.10). Содержание железа в сывороточном ферритине заметно повышается при некоторых заболеваниях, например при некрозе печени. б. Наличие углеводного компонента (Worwood et al., 1977). в. Ферритин из сыворотки здоровых доноров проявляет наиболее высокое сродство к антисыворотке против печеночного ферритина. Однако сывороточный ферритин, вырабатываемый организмом при опухолях, более активно взаимодействует с антисывороткой к ферритину миокарда. Наблюдаемая картина распределения при ИЭФ множественных форм сывороточного ферритина позволяет обнаружить аналогичную закономерность: в норме эта картина близка к ИЭФ-профилю печеночного белка, а при опухолях становится похожей на профиль фокусирования изоферритинов миокарда (Halliday et al., 1976). Общий уровень сывороточного ферритина обычно замет-

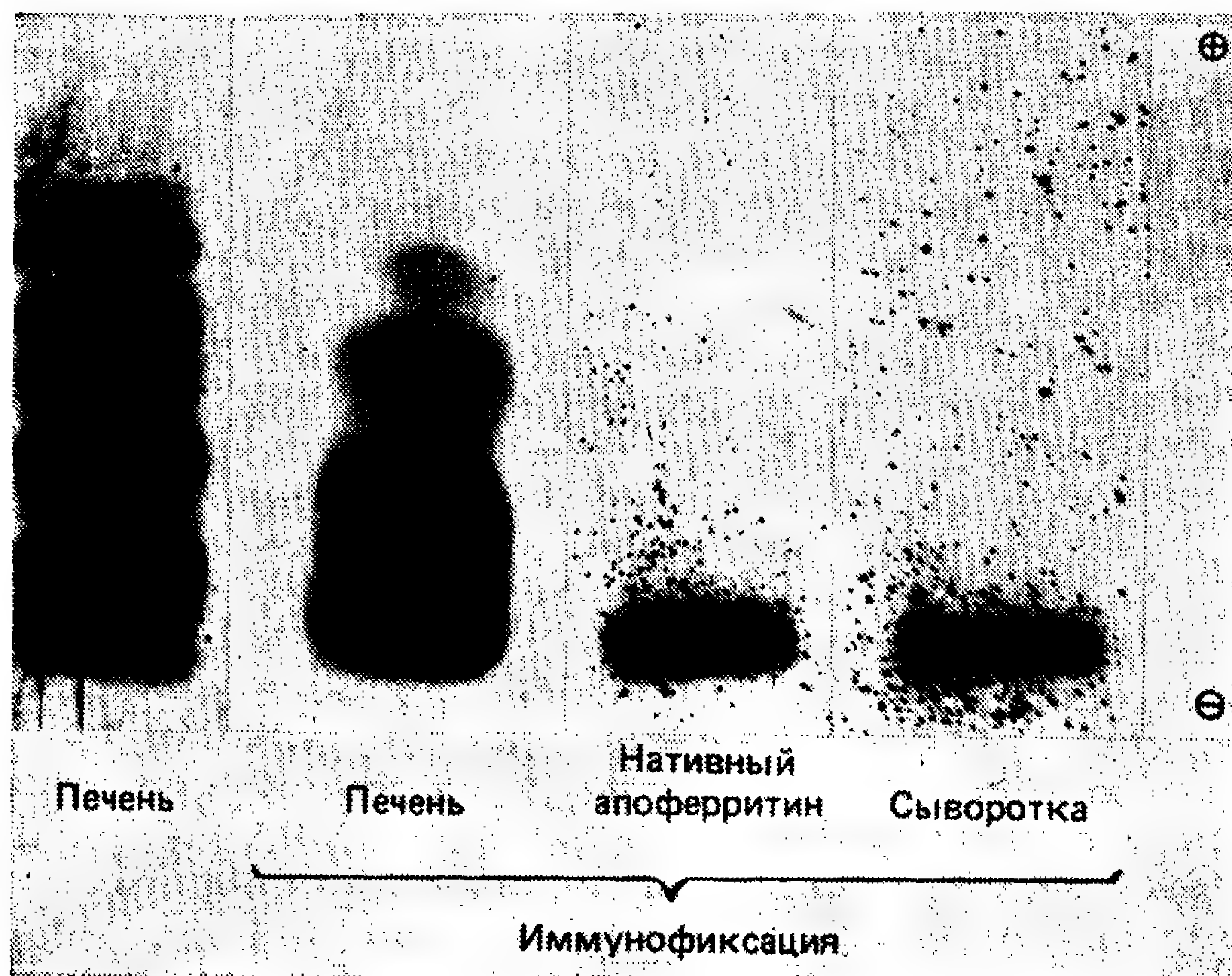


Рис. 5.10. Сравнение профилей ИЭФ сывороточного ферритина (образующегося при избыточном содержании железа), нативного апоферритина и ферритина из печени. Крайний левый профиль — обычное окрашивание с помощью СВВ, остальные — иммунофиксация. Сывороточный ферритин и нативный апоферритин фокусируются в виде единственной наиболее щелочной зоны и, возможно, представляют собой сополимеры, состоящие только из L-субъединиц. (Drysdale et al., 1977.)

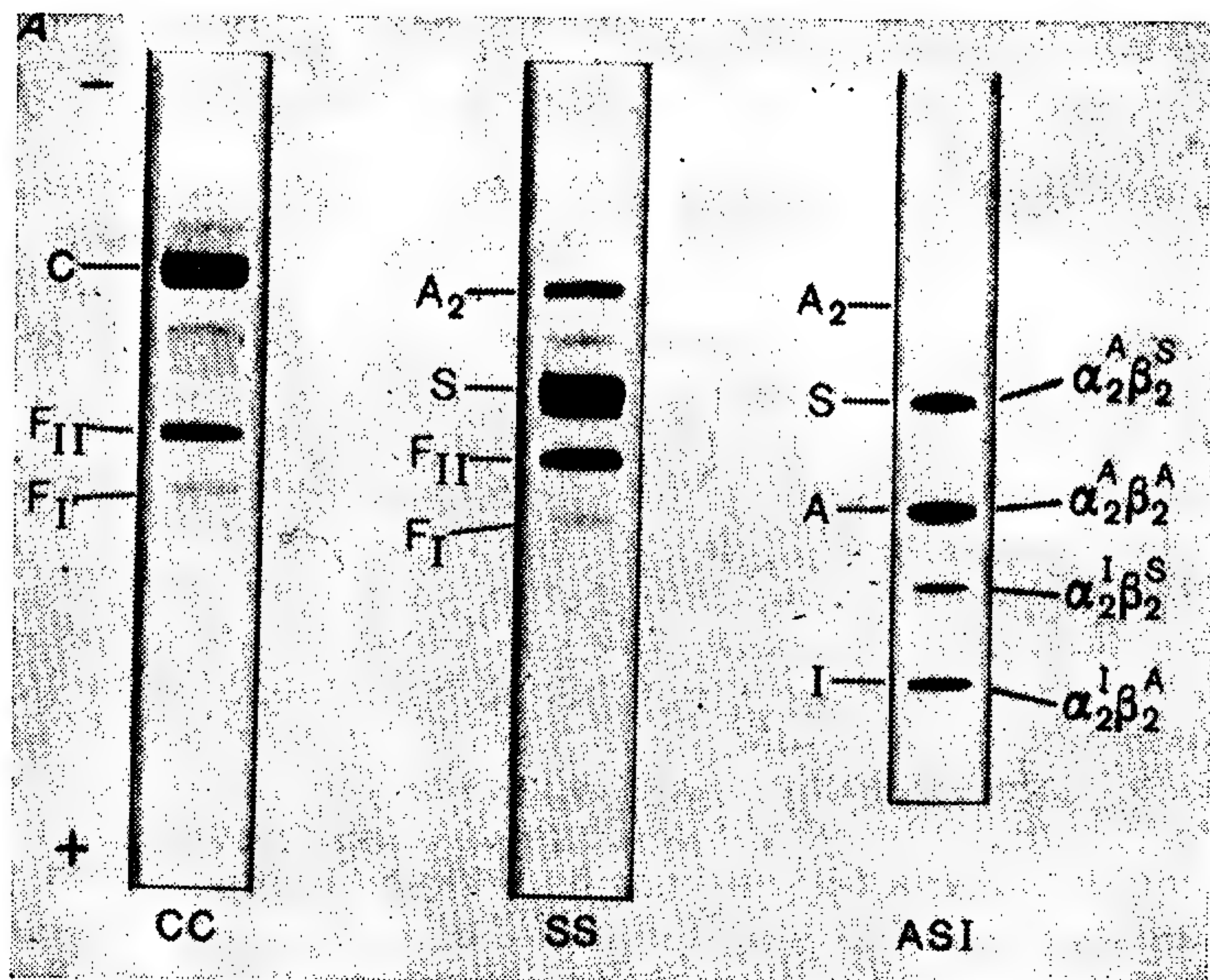
но возрастает при карциноме, лейкемии, миеломе и гепатоме (Niitsu et al., 1975). Согласно данным Gropp et al., 1978, сывороточный ферритин может служить удобным опухолевым маркером в дополнение к используемому в тех же целях карциноэмбриональному антигену.

5.4. ИЭФ гемоглобинов

Сейчас ИЭФ гемоглобинов (последние обзоры по этой теме — Bunn, 1977, и Basset et al., 1982) стало рядовым методом анализа в гематологических отделениях клиник. Метод используется при массовом скрининге образцов крови, а также при диагностике различных случаев гемоглобинопатии. К 1976 г. были описаны 269 мутантных гемоглобинов со следующим распределением мутаций по цепям: 80 в α-цепях, 166 в β-цепях, 14 в γ-цепях и 9 в δ-цепях (Bunn et al., 1977). На сегодняшний день число известных генетических вариантов превышает 300.

К счастью, большинство описанных мутаций, судя по всему, не имеет патологического характера. Известно также 9 мутаций, проявляющихся в изменении длины гемоглобиновых цепей, в том числе 6 вариантов делеций в β-цепи (от одного до пяти соседних аминокислотных остатков) и одна вставка из десяти остатков на С-конце β-цепи. Поскольку структурные гены гемоглобинов γ, δ и β в хромосоме примыкают друг к другу, в результате неравного кроссинговера при обычном мейозе может происходить слияние этих генов, проявляющееся в образовании гибридных цепей, содержащих одновременно фрагменты последовательностей Hbδ и Hbβ (например, гемоглобин Lepor) Hbβ и Hbδ (например, гемоглобин Miyada) или Hbγ и Hbβ (например, гемоглобин Kenia). Описаны еще два варианта цепей, содержащих дополнительные аминокислотные остатки на С-конце.

Генетические варианты. ИЭФ оказалось весьма эффективным методом обнаружения мутантных гемоглобинов. Первые эксперименты в этой области с использование ИЭФ в цилиндрических гелях были описаны в работе Drysdale et al., 1971. На рис. 5.11,*А* показаны типичные ИЭФ-профили проб из крови доноров, гомозиготных по HbC (замена в β-цепи Glu-6⟶Lys-6) и HbS (β-цепь: Glu-6⟶Val-6), а также доноров с двойной гетерозиготностью типа ASI. Все образцы содержат следы $HbA_2(\alpha_2\delta_2)$, а оба гомозиготных образца — некоторое количество фетальных гемоглобинов F_I и F_{II}. Впоследствии для опреде-



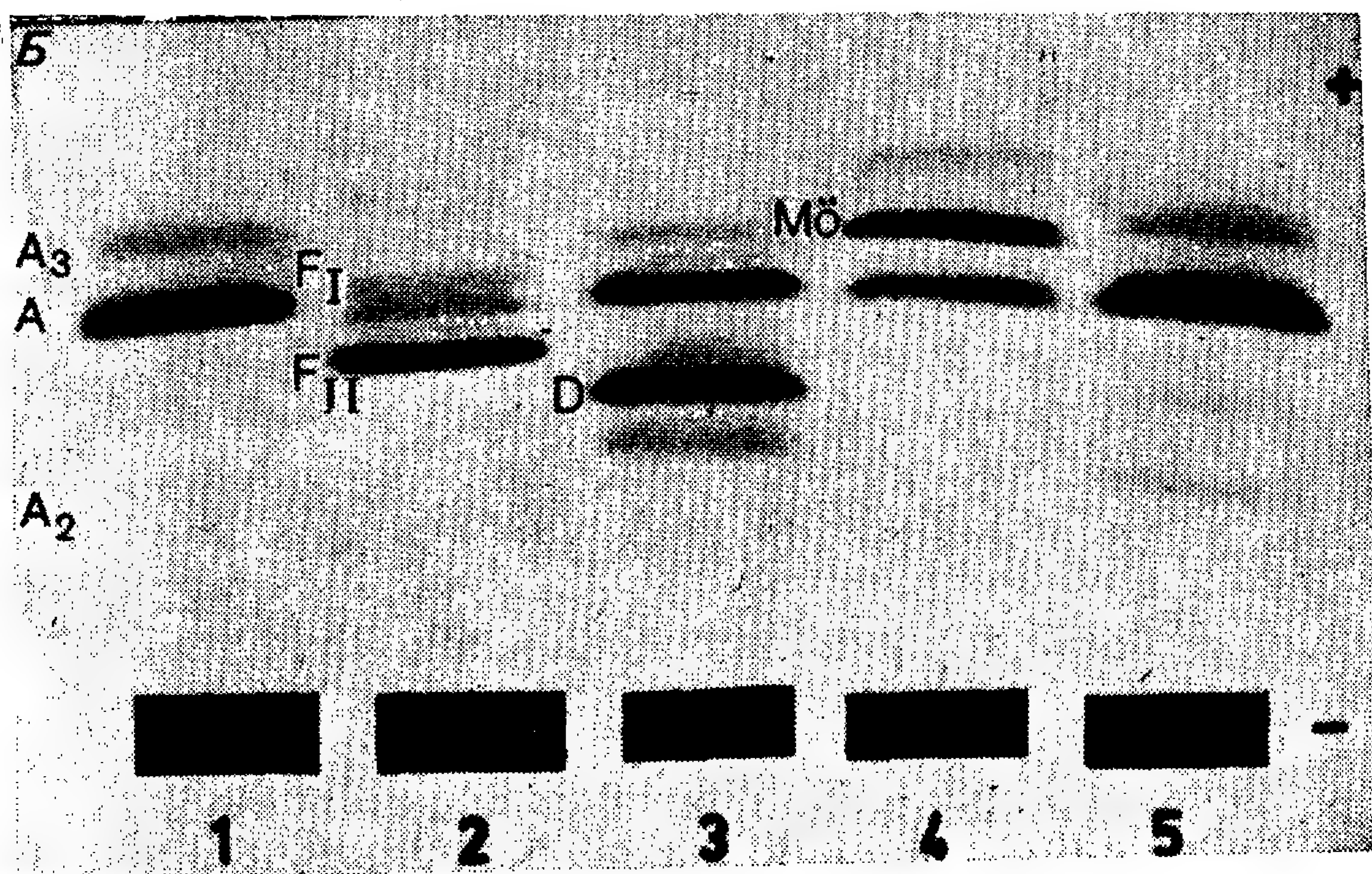


Рис. 5.11. *А*. ИЭФ генетических вариантов гемоглобина. Условия ИЭФ: 5%-ные акриламидные гели, содержащие 2% амфолинов рН 6—8. *Слева направо*: гомозиготность по HbC; гомозиготность по HbS и гетерозиготность типа A/SI (Drysdale et al., 1971). *Б*. ИЭФ гемоглобинов человека в диапазоне рН 6—10. 1 и 5 — Hb из крови нормального взрослого донора, 2 — Hb из крови пупочного канатика, 3 — Hb из крови пациента, гетерозиготного по HbD Punjab, 4 — Hb из крови пациента, гетерозиготного по Hb Malmö. (Jeppson, Berglund, 1972.)

ления генетических вариантов гемоглобина было предложено использовать ИЭФ в плоских горизонтальных гелях, которое сегодня является наиболее распространенным в этой области методом. На рис. 5.11,*Б* показан пример использования этого метода для обнаружения нового мутантного гемоглобина Malmö. С помощью ИЭФ был обнаружен и охарактеризован целый ряд неизвестных ранее генетических вариантов, в том числе Hb Cochin-Port-Royal (Wajcman et al., 1975), Hb Wood (Taketa et al., 1975); Hb Bicêtre (Wajcman et al., 1976); Hb Pontoise (Thillet et al., 1977); Hb Rothschild (Gacon et al., 1977a) и Hb Djelfa (Gacon et al., 1977a). Особенно активно использовался метод ИЭФ в плоских гелях для скриннинга гемоглобинов в исследовательской группе Роза (Кретей) (Monte et al., 1976; Basset et al., 1978). Авторы составили карту, включающую более 80 различных гемоглобинов человека, которым отвечают примерно 50 дискретных полос при ИЭФ в геле (рис. 5.12). Как видно из этой карты, большинство гемоглобинов фокусируется в пределах отрезка протяженностью менее 1 ед. рН — от pI~6,6 до pI~7,5. На карте можно выделить три группы вариантов — группы «С-подобных», «S-подобных» и «А-подобных» гемогло-

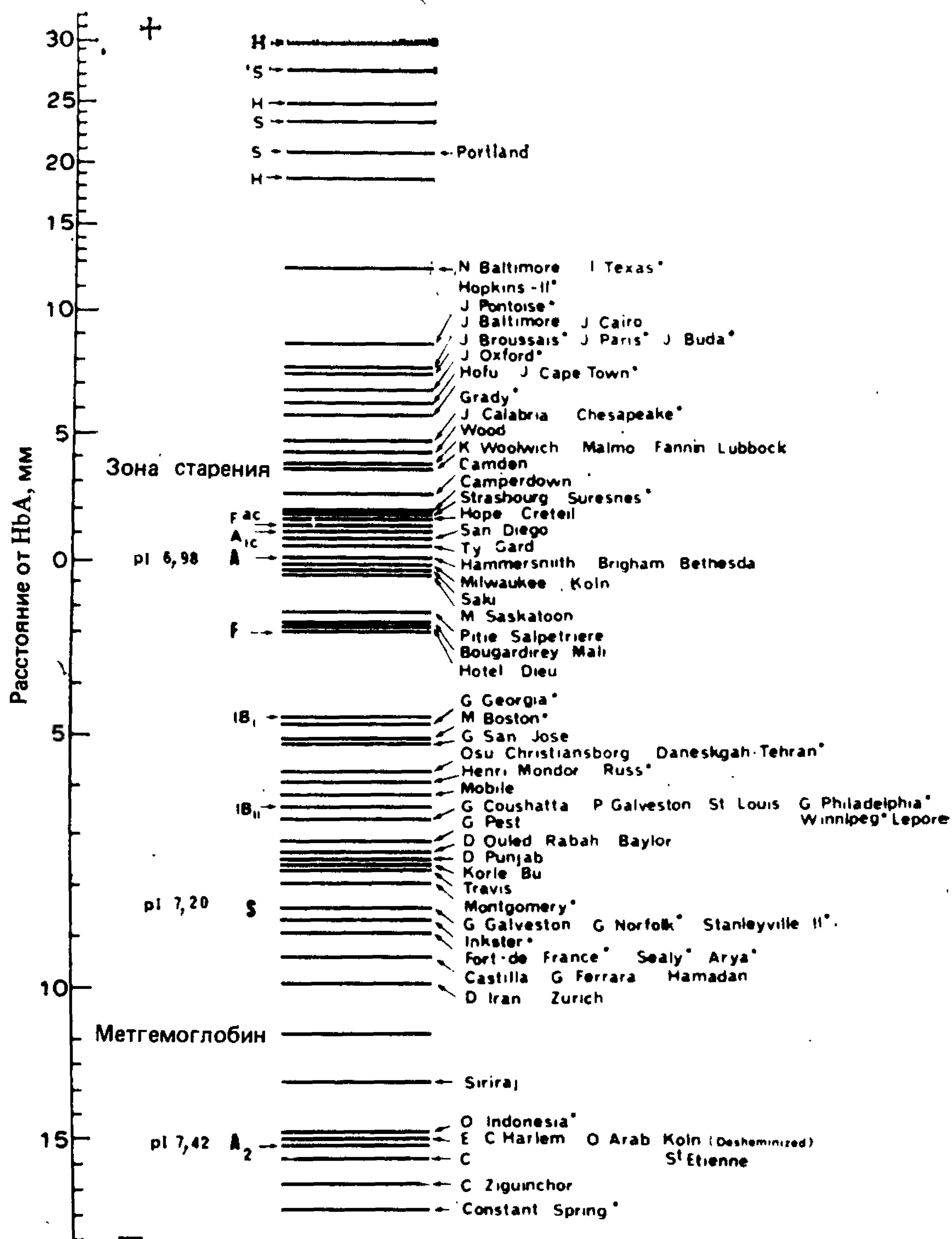


Рис. 5.12. Карта ИЭФ 79 вариантов гемоглобина человека, характеризующихся примерно 50 различными значениями pI. Звездочкой помечены мутации в α-цепи. IB_I и IB_{II} — валентные (Fe^{2+}—Fe^{3+}) гибриды HbA. (Basset et al., 1978.)

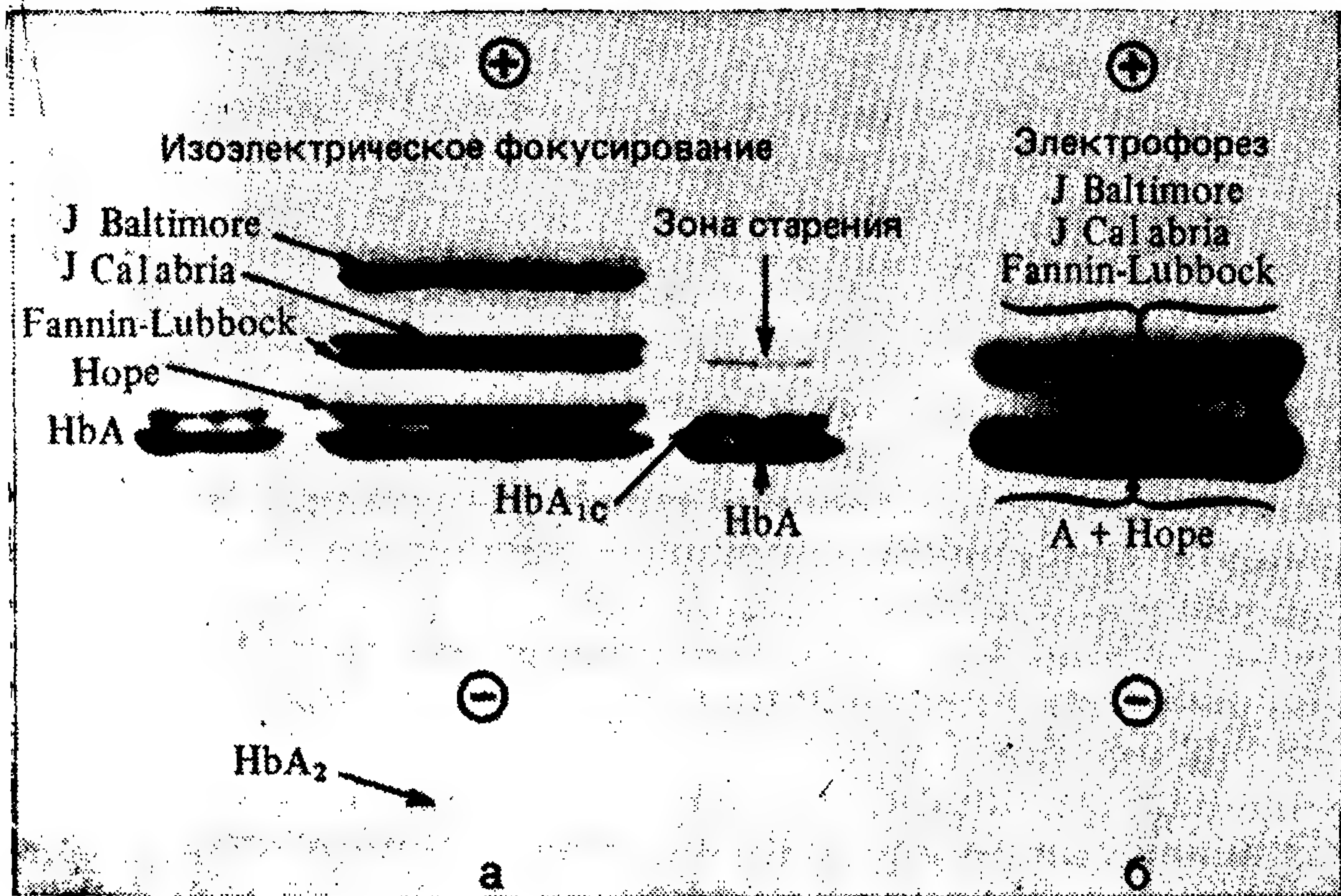


Рис. 5.13 Фракционирование смеси четырех вариантов гемоглобина А, несущих однотипные аминокислотные замены: а — ИЭФ в градиенте pH 6—9; б — электрофорез на ацетилцеллюлозной пленке в щелочной среде. (Basset et al., 1982.)

бинов. Область «С-подобных» вариантов заселена наименее плотно, в ее рамках почти все соответствующие мутанты удается получить в виде неперекрывающихся индивидуальных зон. «S-область», напротив, заселена очень плотно; в нее входят более 30 различных мутантов с очень близкими значениями pI. Поэтому гомозиготное S/S-состояние, лежащее в основе серповидно-клеточной анемии и проявляющееся в образовании наиболее распространенного на Земле мутантного HbS, при ИЭФ легко спутать с менее опасными генотипическими состояниями (например, с двойной гетерозиготностью по HbS/D, или HbS/P, или HbS/G). В этих случаях ИЭФ следует сочетать с другими, дополнительными тестами. «А-область» карты тоже заселена очень плотно; в нее входят, в частности, несколько важных патологических вариантов, в их числе Hb Köln и Hb St. Etienne (которые склонны к потере гема), а также гемоглобины типа M, вызывающие врожденный цианоз, поскольку они очень легко окисляются в мет-форму. Там же фокусируются некоторые гемоглобиновые варианты, обладающие повышенным сродством к кислороду (например, гемоглобины Bethesda, Brigham, Olympia) и часто сопутствующие эритроцитозу или хроническому гемолизу. Таким образом, и при определении гемоглобинов из «А-области» помимо ИЭФ следует провести другие, независимые

исследования. Несмотря на это, можно отметить, что с помощью ИЭФ удается достичь значительно более тонкого разделения мутантных гемоглобинов, чем при обычном электрофорезе на ацетилцеллюлозных мембранах в щелочной среде или при фракционировании в цитрат-агаре.

Для того чтобы оценить разницу между экспериментальными возможностями методов ИЭФ в плоском геле и традиционного электрофореза, достаточно взглянуть на рис. 5.13. Гемоглобин А смешивали с четырьмя мутантными вариантами HbA, несущими однотипные замены (Gly⟶Asp); для сравнения смесь подвергали ИЭФ и электрофорезу на ацетилцеллюлозе. Видно, что при ИЭФ удается различить все пять ожидаемых зон, а при электрофорезе — только две (Basset et al., 1982).

Эффект Бора. Как было показано в работе Perutz, 1970, восстановленный гемоглобин находится в напряженной, так называемой Т-форме (от англ. taut), жесткая структура которой поддерживается множеством внутри- и межсубъединичных ионных связей. При связывании с гемом лигандов, таких как CO

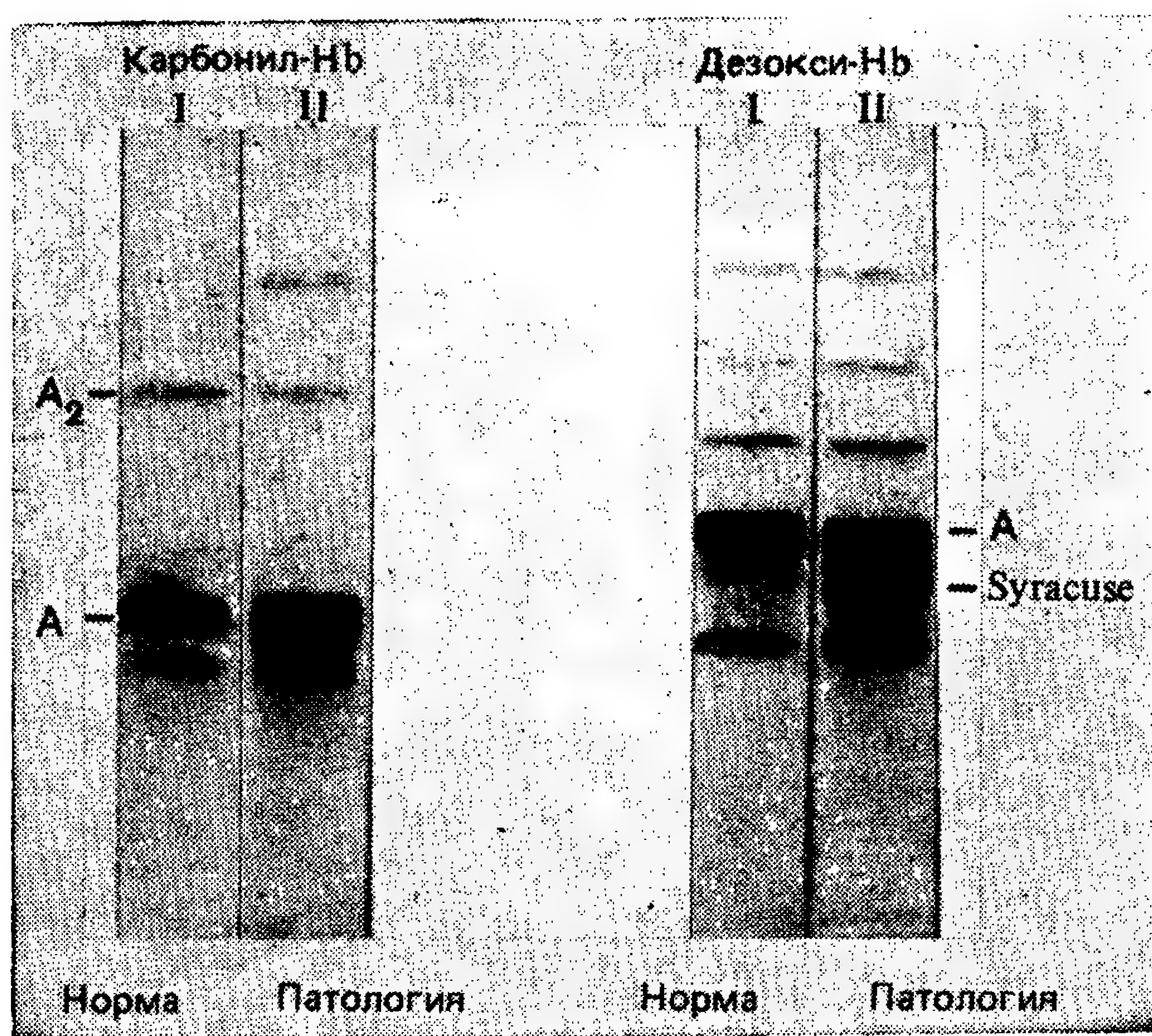


Рис. 5.14. Сравнение профилей ИЭФ гемолизатов: I — нормальная кровь, II — кровь, содержащая гемоглобин Syracuse. *Слева* — гемоглобин, насыщенный CO; *справа* — дезоксигемоглобин. Более высокое разрешение, наблюдаемое в случае ИЭФ гемоглобинов А и Syracuse, лишенных лиганда, вызвано тем, что для последнего характерен относительно слабый эффект Бора. (Jensen et al., 1975.)

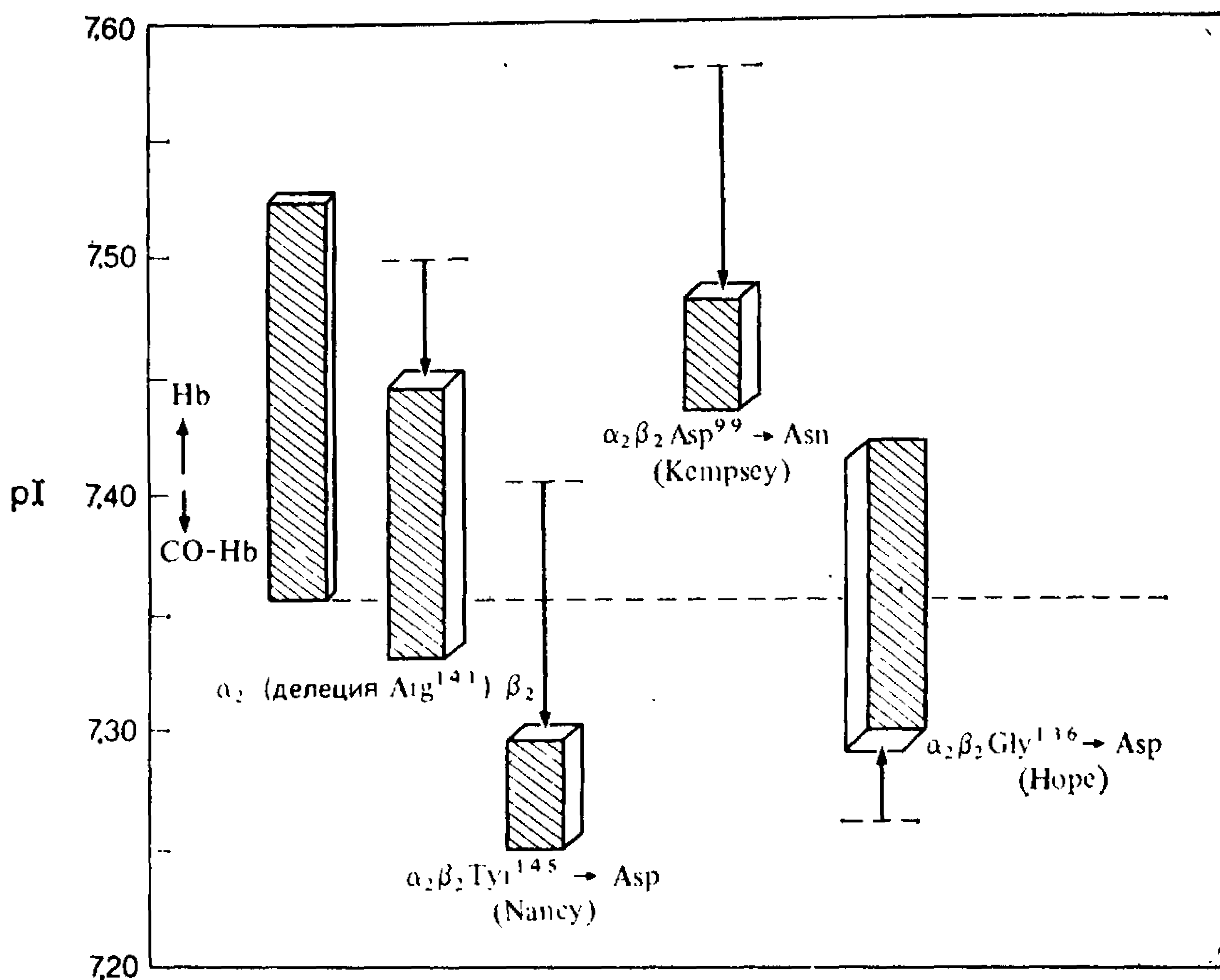


Рис. 5.15. Схематическое представление обнаруживаемых с помощью ИЭФ изменений pI (ΔpI) при переходе различных гемоглобинов человека из дезокси- в окси-форму. Все мутантные гемоглобины характеризуются более низкими по сравнению с HbA_0 (*крайний слева*) значениями ΔpI и более слабым эффектом Бора в растворе. Штриховые прямые с идущими от них стрелками указывают разность между значениями ΔpI для HbA_0 и для мутантных гемоглобинов. Направленне стрелок предположнтельно указывает, на каком из двух альтернативиых значений pI (дезокси- или окси-формы) в большей степени сказывается та или иная мутация. (Poyart et al., 1981.)

или O_2, ионные связи разрываются и происходит кооперативный переход белка в ненапряженную R-форму (от англ. relaxed), которая характеризуется значительно более высоким сродством к лигандам. Известно, что не содержащая кислорода T-форма более прочно связывает протоны, чем R-форма, и, таким образом, дезокси-Hb характеризуется значительно более высоким значением pI, чем окси-Hb. Это легко продемонстрировать с помощью ИЭФ (Bunn, McDonough, 1974): пурпурная полоса дезокси-Hb имеет pI 7,07, что примерно на 0,12 ед. pH выше, чем изоточка красной полосы карбонил-Hb (pI 6,95). Зная это, для улучшения разрешения при ИЭФ гемоглобина A и некоторых мутантов с очень близкой изоточкой можно воспользоваться эффектом Бора в том случае, если мутанты аномальны в

этом отношении. На практике это было продемонстрировано для случая мутантного Hb Syracuse (Jensen et al., 1975). Этот мутантный гемоглобин, не отделяющийся от HbA при обычном электрофорезе, характеризуется очень высоким сродством к кислороду и примерно вдвое меньшим (по сравнению с нормой) эффектом Бора. При ИЭФ наблюдается лишь частичное разделение окси-форм и значительно более полное разделение дезоксиформ нормального и мутантного гемоглобинов (рис. 5.14).

С помощью ИЭФ можно весьма точно оценить характерный щелочной эффект Бора для нормального и мутантного гемоглобинов человека (Poyart et al., 1981). Эффект Бора оценивается по разности между значениями pI гемоглобинов, полностью лишенных лигандов (дезоксиформа), и полностью насыщенных CO (ΔpI). Для гемоглобина A значение ΔpI составляет 0,17 ед. pH, что соответствует различию в 1,2 положительных заряда между окси- и дезоксиформами тетрамерного HbA. Для мутантных или химически модифицированных вариантов HbA, содержащих измененные N- или C-концевые участки последовательности в α-цепях, значение ΔpI может уменьшаться на 30%. При изменении C-концевого участка последовательности в β-цепи, как в HbNancy, значение ΔpI оказывается на 70% меньше, чем для нормального HbA (рис. 5.15). Более того, даже для гемоглобинов, характеризующихся обычным значением $\Delta pI_{50}/\Delta pH$, с повышением pI оксиформы наблюдается снижение ΔpI, что свидетельствует о pH-зависимости эффекта Бора. Эти данные, полученные на основе ИЭФ, хорошо согласуются с существующими представлениями о соответствующем вкладе функциональных групп двух аминокислотных остатков, Val-1α и His-146β, играющих важнейшую роль в реализации характерного щелочного эффекта Бора (Kilmartin et al., 1973; Perutz et al., 1980). На мутантных гемоглобинах было также показано, что наблюдаемое значение ΔpI может уменьшаться или даже становиться равным нулю в тех случаях, когда замены аминокислотных остатков приводят к дестабилизации одной из двух или обеих возможных четвертичных структур тетрамера и (или) к заметному уменьшению величины L-аллостерической константы.

Степень окисления железа в геме. Некоторые мутантные гемоглобины, несущие замены проксимального (F8) или дистального (E7) остатков гистидина, проявляют склонность к спонтанному окислению или элиминации гема. К первой группе принадлежат гемоглобины типа M. Известны четыре гемоглобина этого типа, в каждом из которых один из четырех функционально важных остатков гистидина α- и β-цепей замещен на остаток тирозина, что приводит к образованию прочной связи с окислен-

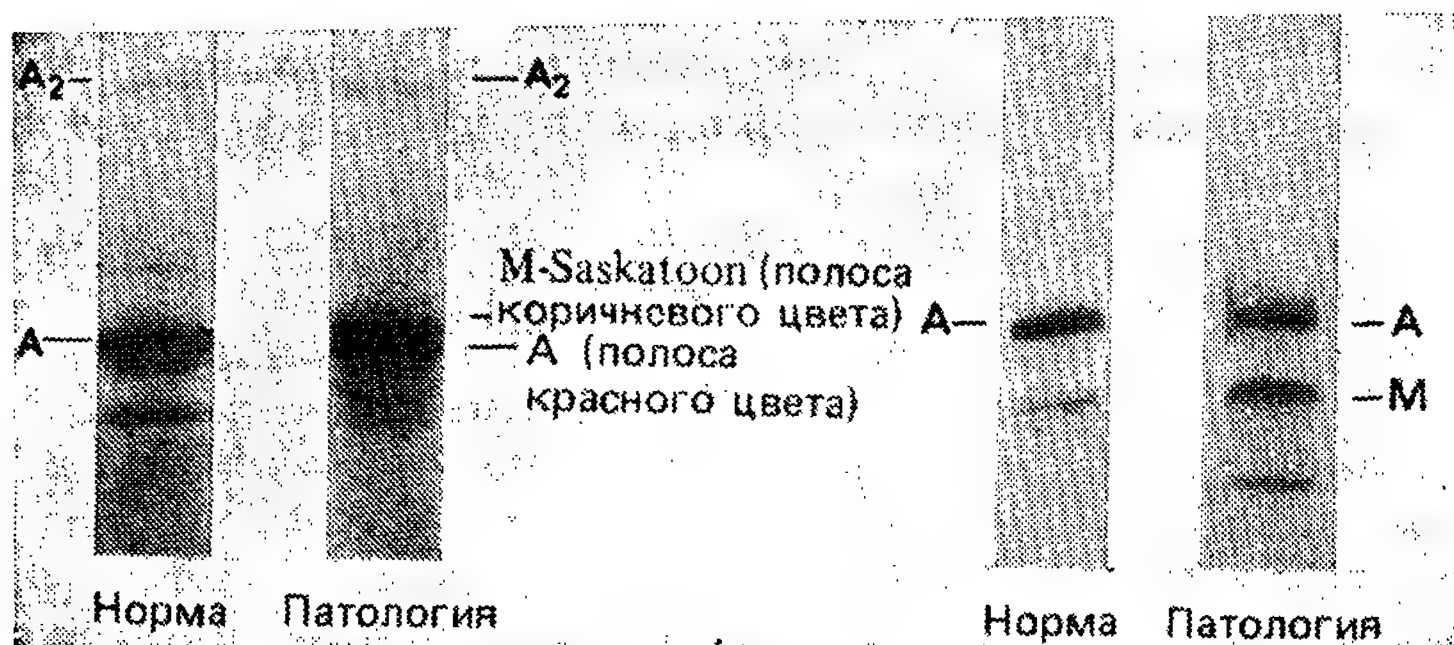


Рис. 5.16. Профили ИЭФ в геле гемолизатов, содержащих мутантный гемоглобин M Saskatoon. *Слева* — фракционирование оксиформ с относительно невысоким разрешением красной полосы HbA и коричневой полосы HbM Saskatoon. *Справа* — фракционирование после обработки феррицианидом; разрешение полос HbA и HbM Saskatoon значительно повышается. (Bunn et al., 1977.)

ным гемом. Во вторую группу входят неустойчивые мутантные гемоглобины, такие, как Gun Hill (Bradley et al., 1967) и St. Etienne (Beuzard et al., 1972), в которых остаток His β-цепи в первом случае отсутствует (делеция), а во втором замещен на остаток глутамина. В этих гемоглобинах невозможно связывание гема с β-цепями. За счет изменения степени окисления железа в геме можно достичь значительно более высокого разрешения при ИЭФ гемоглобинов типов M и A. Так, обычно Hb M Saskatoon (β63 : His⟶Tyr) (Bunn, 1977) и Hb M Bicêtre (β63 : His⟶Pro) (Wajcman et al., 1976) фокусируются в виде четких коричневых полос с pI несколько выше, чем pI красной полосы нормального HbA. Нормальный и мутантные гемоглобины разделяются не полностью, что осложняет их количественное определение при сканировании. С другой стороны, после окисления феррицианидом достигается значительно более полное разделение гемоглобинов M и A (рис. 5.16). Метгемоглобин A имеет существенно более высокую изоточку (т. е. несет больше поверхностных положительных зарядов), чем метгемоглобин M, поскольку в аномальных субъединицах последнего заряд ионов Fe^{3+} частично компенсируется аномальными аминокислотами (Tyr вместо His).

Валентные гибриды. Окисленные формы не ограничиваются только мутантными гемоглобинами. Оказывается, что in vitro нормальный гемоглобин взрослого человека также подвержен спонтанному аутоокислению. Однако in vivo в норме гемоглобин в основном находится в восстановленной форме, поскольку для нормального функционирования в организме гем должен содержать ион Fe^{2+}. Гемоглобин, содержащий ион железа в сте-

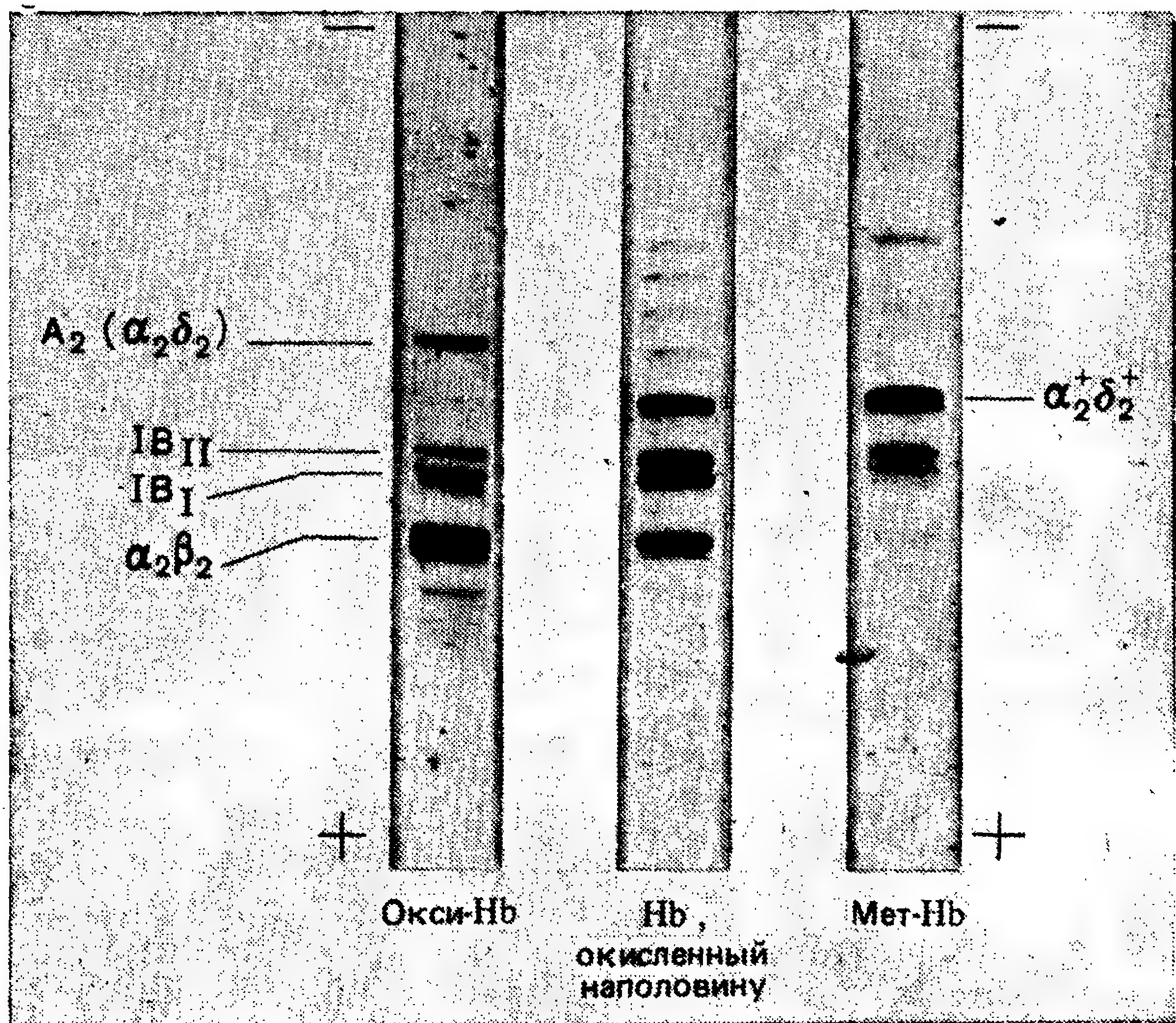


Рис. 5.17. Фракционирование окисленных форм гемоглобина человека при ИЭФ гемолизатов в 0,05 М фосфатном буфере рН 7,1. *Слева* — гемолизат без добавления окислителя; *в центре* — гемоглобин, частично окисленный при добавлении 0,5 эквивалента феррицианида; *справа* — гемоглобин, полностью окисленный при добавлении избытка феррицианида. На приведенных профилях ИЭФ содержание ферригемоглобина составляет 50 и 100% соответственно. (Bunn, Drysdale, 1971.)

пени окисления III (метгемоглобин), не способен связывать кислород. Несмотря на существенные различия в заряде между Fe^{2+}-гемоглобином ($\alpha_2\beta_2$) и разнообразными окисленными формами ($\alpha^+{}_2\beta_2$, $\alpha_2\beta_2{}^+$, $\alpha_2{}^+\beta_2{}^+$), эти формы не удавалось обнаружить с помощью традиционного электрофореза. Напротив, при ИЭФ удается отчетливо разделить и идентифицировать как полностью окисленные формы, так и частично окисленные интермедиаты. Так, после неполного окисления HbA феррицианидом при ИЭФ в геле появляются три новые полосы (рис. 5.17). Полностью окисленный гемоглобин ($\alpha_2{}^+\beta_2{}^+$) проявляется в виде коричневой полосы с pI 7,20, т. е. на 0,25 ед. выше, чем pI неокисленного HbA (Bunn, Drysdale, 1977). На равном удалении от полностью окисленной и полностью восстановленной форм находятся две близкие полосы (обозначены IB_I и IB_{II}), которые, как было по-

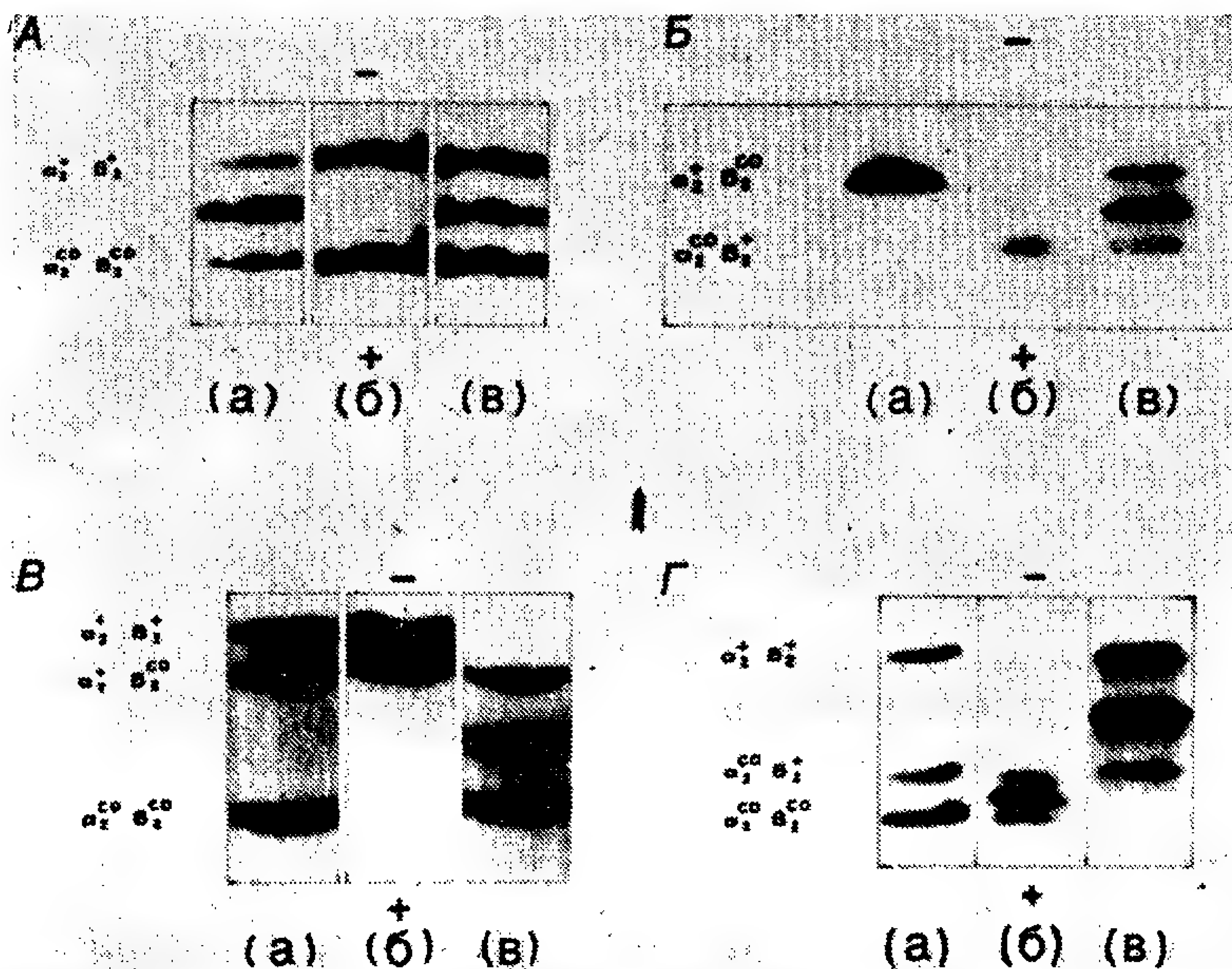


Рис. 5.18. Профили ИЭФ (—23 °С) различных образцов гемоглобина. Стрелка указывает направление возрастания $pa_{н}$[1] в гелях. *А*. (а) — готовили смесь $\alpha_2^+\beta_2^+$ с $\alpha_2^{CO}\beta_2^{CO}$, инкубировали 5 мин при 0 °С; реакцию обмена останавливали и смесь разделяли с помощью ИЭФ при —23 °С, как описано в тексте; (б) — смесь $\alpha_2^+\beta_2^+$ с $\alpha_2^{CO}\beta_2^{CO}$ инкубировали при —23 °С и $pa_{н}=8{,}5$ в течение 30 мин перед ИЭФ; (в) — то же, что и (б), но при $pa_{н}=7{,}5$. *Б*. (а) — $\alpha_2^+\beta_2^{CO}$; (б) — $\alpha_2^{CO}\beta_2^+$; (в) — смесь $\alpha_2^+\beta_2^{CO}$ и $\alpha_2^{CO}\beta_2^+$ инкубировали при 0 °С в течение 5 мин; останавливали реакцию обмена охлаждением до —23 °С. *В*. (а) — смесь $\alpha_2^+\beta_2^+$, $\alpha_2^+\beta_2^{CO}$ и $\alpha_2^{CO}\beta_2^{CO}$ инкубировали при —23 °С и $pa_{н}=8{,}5$ в течение 5 мин перед ИЭФ; (б) — смесь $\alpha_2^+\beta_2^+$ и $\alpha_2^+\beta_2^{CO}$ инкубировали 5 мин при 0 °С и затем охлаждали до —23 °С; (в) — смесь $\alpha_2^+\beta_2^{CO}$ и $\alpha_2^{CO}\beta_2^{CO}$ инкубировали 5 мин при 0 °С и охлаждали до —23 °С. *Г*. (а) — смесь $\alpha_2^+\beta_2^+$, $\alpha_2^{CO}\beta_2^+$ и $\alpha_2^{CO}\beta_2^{CO}$ перед ИЭФ инкубировали в течение 5 мин при —23 °С и $pa_{н}=8{,}5$; (б) — смесь $\alpha_2^{CO}\beta_2^+$ и $\alpha_2^{CO}\beta_2^{CO}$ инкубировали 5 мин при 0 °С, а затем охлаждали до —23 °С; (в) — смесь $\alpha_2^{CO}\beta_2^+$ и $\alpha_2^+\beta_2^+$ инкубировали 5 мин при 0 °С и охлаждали до —23 °С. (Perrella et al., 1981.)

[1] $pa_{н}$ — отрицательный десятичный логарифм эффективной концентрации, т. е. активности ионов водорода ($a_{н}$). — *Прим. перев.*

казано в работе Park, 1973, отвечают формам $\alpha_2\beta_2^+$ и $\alpha_2^+\beta_2'$ соответственно. Сам факт разделения двух этих компонентов в данной системе является дополнительным подтверждением представления о различиях в микроокружении гема в α- и β-цепях. Эти различия (конформационные переходы) в свою очередь порождают небольшие локальные различия поверхностного заряда у двух в целом одинаково заряженных белков.

Оказывается, что в действительности дело обстоит намного

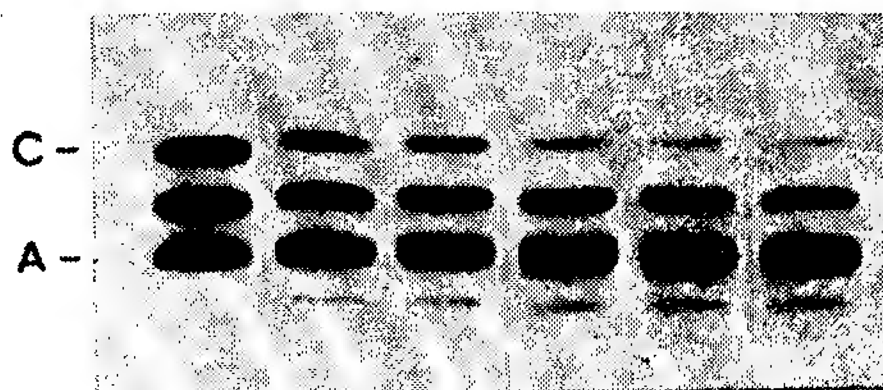
сложнее. Теоретически при частичном окислении $\alpha_2\beta_2$ должны образовываться десять различных «валентных гибридов» (Perrella et al., 1981). То обстоятельство, что из десяти возможных форм были обнаружены только четыре, означает, что остальные формы в данных условиях оказываются неустойчивыми. Добавляя раствор гемоглобина, частично насыщенного СО, к водно-органической смеси, содержащей феррицианид, удалось получить статистический набор частично окисленных СО-содержащих тетрамеров. При низкотемпературном ИЭФ (до −23 °С) этой смеси удается разделить и обнаружить все 10 валентных гибридов (рис. 5.18). Этот пример прекрасно иллюстрирует возможности применения метода ИЭФ для структурных исследований.

Субъединичный обмен. В физиологических условиях (рН 7,4; 37 °С) кислородсодержащий гемоглобиновый тетрамер легко и обратимо диссоциирует на $\alpha\beta$-димеры:

Hb, насыщенный O_2 или CO: $\alpha_2\beta_2 \rightleftarrows 2\alpha\beta$; $K_{4,2} \simeq 2 \cdot 10^{-6}$ М. Поэтому в растворе, содержащем два различных гемоглобина, например HbA и HbS, должно происходить и образование гибридного Hb типа $\alpha_2\beta^A\beta^S$. По сути дела, при одинаковом соотношении HbA и HbS 50% тетрамеров будут гибридными. Однако существование гибридов не удавалось продемонстрировать с помощью обычных электрофоретических или хроматографических методов, поскольку в процессе разделения гибридные тетрамеры распадаются на идентичные димеры с различными зарядами и в таком виде подвергаются фракционированию. Используя ИЭФ в геле, присутствие гибридных компонентов удается выявить благодаря тому, что гемоглобин, не связанный с O_2 или другими лигандами, значительно меньше подвержен диссоциации:

$$\text{Дезокси-Hb: } \alpha_2\beta_2 \rightleftarrows 2\alpha\beta;\ K_{4,2} \simeq 3 \cdot 10^{-12}\ \text{М}$$

В работе Bunn, McDonough, 1974, образование асимметричных гибридных тетрамеров было показано для смеси HbA и HbC (рис. 5.19). Наблюдая за исчезновением гибридной полосы при продолжительном фокусировании, авторы также оценили константу скорости диссоциации дезоксигемоглобинового тетрамера на димеры. Она оказалась равной 0,3 $ч^{-1}$ при рН 7,2, 24 °С, что на порядок отличается от оценки, полученной в работе Nagel, Gibson, 1971. Образование аналогичных гибридных форм наблюдалось также при низкотемпературном ИЭФ (−20 °С) гемоглобинов, связанных с лигандами (Perrella et al., 1978). Тот факт, что биологически важные короткоживущие интермедиаты удается зафиксировать и проанализировать в условиях низкотемпературного ИЭФ, очень важен, в том числе с точки зре-



C, % (в исходной смеси)	48	37	34	29	25	22
C, % (ожидаемое значение)	24	14	11	8	6	5
C, % (полученное значение)	27	18	15	10	8	7
Гибридный гемоглобин, % (ожидаемое значение)	50	46	45	41	37	34
Гибридный гемоглобин, % (полученное значение)	43	38	37	38	33	29

Рис. 5.19. Обнаружение «гибридного» гемоглобина $\alpha_2\beta^A\beta^C$. Из смесей с различным содержанием оксигемоглобинов А и С удаляли кислород, после чего их вносили в гель и фокусировали в анаэробных условиях. Через 60 мин гели фотографировали и сканировали при 555 нм. Относительное содержание гемоглобина С и «гибридного» гемоглобина (оцениваемое с помощью сканирования) в каждом случае оказывается близким к ожидаемым значениям, которые можно рассчитать, исходя из биномиального распределения $a^2+2ab+b^2=1$. (Bunn, McDonough, 1974.)

ния возможностей применения этого подхода к изучению промежуточных состояний в ферментативных реакциях.

ИЭФ глобиновых цепей. Для четкого выявления синдрома талассемии необходимо иметь возможность хроматографически или электрофоретически разделять свободные от гема глобиновые цепи и определять их относительное содержание в образце. В работе Righetti et al., 1979, был предложен новый метод разделения глобиновых цепей с помощью ИЭФ в присутствии 8 М мочевины и детергентов (1—3%-ный нонидет NP-40). В этом методе, вероятно за счет связывания детергента с белком, достигается значительно более высокое разрешение β- и γ-глобиновых цепей, что позволяет провести точное денситометрическое или флюорографическое определение их относительного содержания (см. рис. 3.38). Кроме того, в присутствии детергента полоса, соответствующая γ-цепи, расщепляется на две зоны, которые, как было показано, отвечают двум фенотипическим вариантам γ-глобиновых цепей эмбриона человека, различающихся только природой нейтральной аминокислоты в положении 136. В цепи

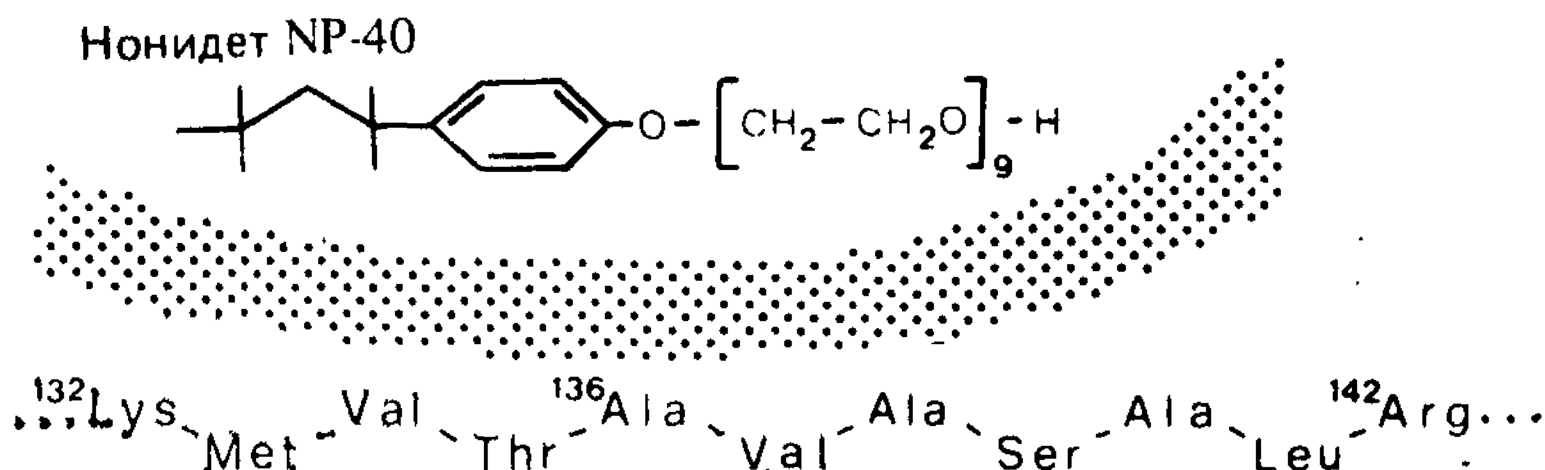


Рис. 5.20. Модель, объясняющая влияние нонидета на разделение A_γ- и C_γ -глобиновых цепей при ИЭФ. Предполагается, что мицеллы детергента связываются преимущественно с гидрофобным сегментом ^{133}Met—^{141}Leu A_γ -цепи. При этом остаток ^{132}Lys может оказаться экранированным из-за погружения его в поверхностный слой Штерна или во внутреннее пространство мицеллы. Таким образом, повышение относительной гидрофобности указанного сегмента в случае одного из фенотипов (A_γ) может стать причиной потери одного целого положительного заряда. (Righetti et al., 1980.)

A_γ — это Ala, а в цепи G_γ — Gly (Comi et al., 1979; Saglio et al., 1979). Согласно Righetti et al., 1980, влияние детергента, вероятно, обусловлено преимущественным связыванием мицелл детергента с гидрофобным участком ^{133}Met—^{141}Leu в A_γ-цепях (рис. 5.20). В этом случае остаток ^{132}Lys может встраиваться в поверхностный слой Штерна мицеллы или даже внутрь мицеллы детергента. Это фактически приводит к потере одного положительного заряда, а значит, и к возникновению различий в суммарном заряде у двух исходно одинаково заряженных цепей.

С использованием настоящего метода удалось проследить за «переключением» биосинтеза с G_γ на A_γ-цепи в процессе развития и созревания эритробластов (Papayannopoulou, 1981). Метод изоэлектрического фракционирования глобиновых цепей был успешно использован для пренатальной диагностики β-талассемии (Gianni et al., 1981) при генетическом консультировании семейных пар в районах с высокой частотой этой аномалии, в частности на Сардинии. ИЭФ в денатурирующих условиях, т. е. в гелях, содержащих 8 М мочевину и NP-40, оказалось также весьма эффективным при изучении гемоглобинов Gower I и Gower II у эмбрионов человека.

В отсутствие детергента оптимальное разрешение α-, ζ-, ε-, β- и γ-цепей достигается при ИЭФ в диапазоне рН 6—9 (Presta et al., 1982). Фракционирование глобиновых цепей в группах ε-G_γ -A_γ-δ-β и ζ-α_2-α_1 имеет большое значение для генетических исследований, поскольку эта система представляет собой один из наиболее подробно изученных примеров скоординированной

и связанной с развитием организма регуляции экспрессии группы родственных генов (Weatherall, Clegg, 1981).

Скриннинг гемоглобинов в пробах крови из пупочного канатика. ИЭФ глобиновых цепей по-прежнему остается наиболее простым и надежным методом установления гомозиготности и гетерозиготности по β-талассемии. Единственное неудобство заключается в длительности и громоздкости процесса подготовки образцов (кислый ацетоновый порошок). В этом смысле значительно удобнее было бы проводить ИЭФ-анализ интактных образцов Hb. Скриннинг на талассемию можно было бы проводить на основе анализа проб крови из пупочного канатика, в которой могут присутствовать только три основных компонента — HbF, HbA и ацетилированный HbF (HbF_{ac}). Успешно проанализировать эту смесь с помощью ИЭФ можно только при хорошем разрешении компонентов HbA и HbF_{ac}, лишь незначительно различающихся по изоточке (Drysdale et al., 1971). В работе Cossu et al., 1982, сообщается о разработке модифицированного варианта ИЭФ, который можно использовать для массового обследования населения в районах с высокой частотой наследственной талассемии. В качестве критерия заболевания вместо отношения β/γ, определяемого при ИЭФ глобиновых цепей, в этом варианте используется отношение HbA/HbF_{ac} (или HbF/HbA), которое определяют при фракционировании нативных гемоглобинов, содержащихся в крови из пупочного канатика новорожденных. Для повышения разрешающей способности в искомой области pH к амфолинам диапазона pH 6—8 добавляли эквимолярное количество амфотерных «разделителей», а именно 0,2 *М* β-аланин и 0,2 *М* 6-аминокапроновую кислоту.

Как видно из рис. 5.21, этот метод позволяет добиться прекрасного разрешения трех зон. Метод отличается простотой, надежностью в определении любой степени проявления талассемии; в качестве рутинного анализа он может быть легко налажен в любом родильном отделении. При проведении массового обследования на Сардинии было установлено, что все новорожденные, в пробах крови которых содержание гемоглобина А ниже 10%, являются гетерозиготными по β-талассемии (Cossu et al., 1982).

ИЭФ минорных гемоглобинов. Определение трех минорных гемоглобиновых компонентов человека имеет особенно важное значение, поскольку контроль за изменениями их уровня может играть существенную роль при диагностике некоторых заболеваний. Так, уровень HbA_2 ($\alpha_2\delta_2$) в крови носителей признака β-талассемии примерно вдвое выше, чем в отсутствие этого признака (Kunkel et al., 1957). HbF ($\alpha_2\gamma_2$) является основным компонентом крови плода или новорожденного и лишь в сле-

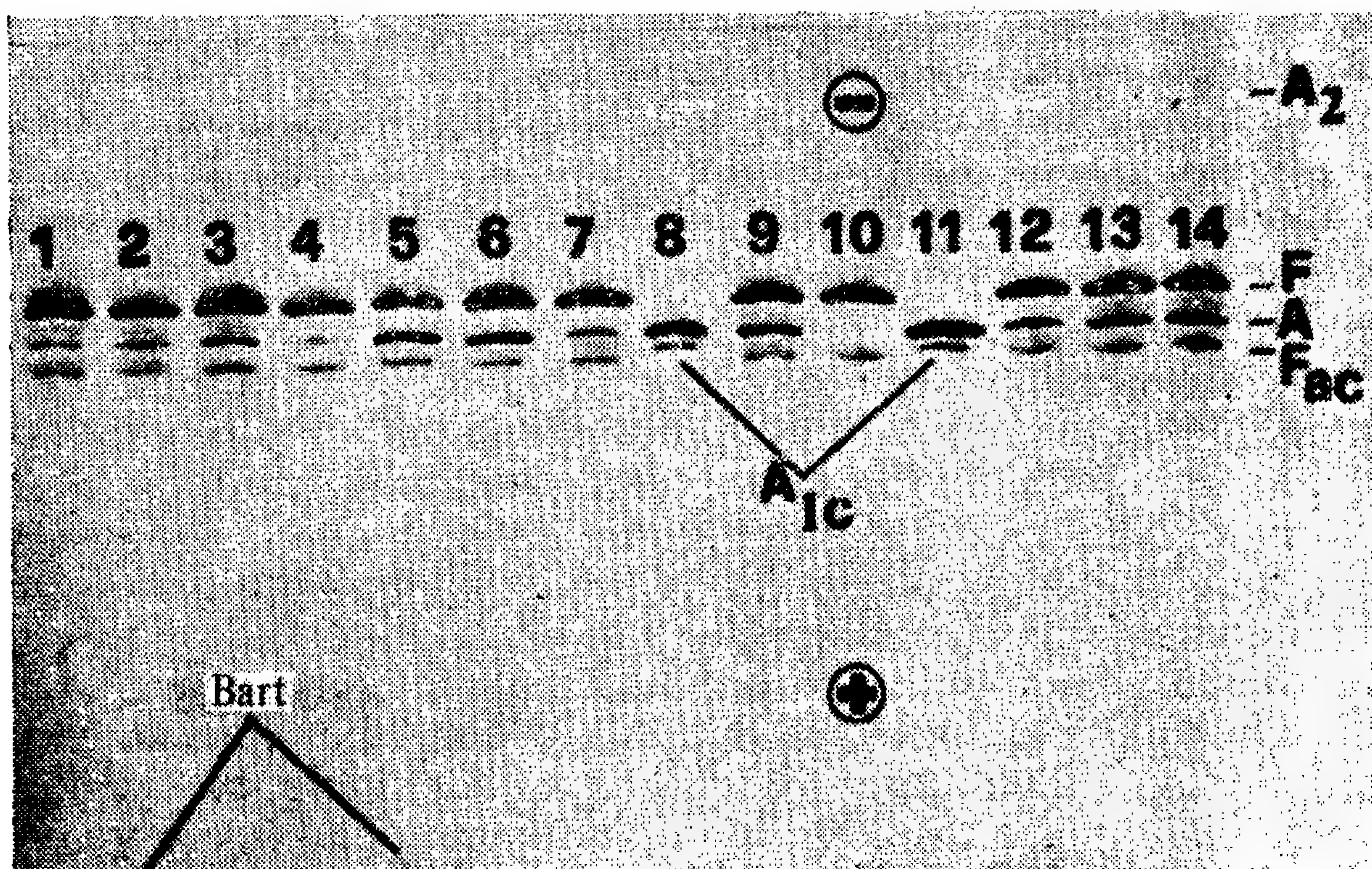


Рис. 5.21. ИЭФ гемолизатов крови пупочного канатика в градиенте pH 6—8 с добавками 0,2 М β-аланина и 0,2 М 6-аминокапроновой кислоты. Условия опыта: $T=6\%$, $C=4\%$, продолжительность ИЭФ 15 мин при постоянном напряжении 400 В и 90 мин при постоянной мощности 15 Вт и максимальном напряжении 1500 В; содержание белка в образце 20 мкг. Относительное содержание HbA в образцах: 1 — 9,1%; 2 — 11,4%; 3 — 14,7%; 4 — 7,9%; 5 — 31,1%; 6 — 28,9%; 7 — 18,9%; 9 — 31,3%; 10 — 0%; 13 — 28%; 14 — 34,3%. Образцы 8 и 11 кровь нормальных взрослых (обратите внимание на полосы HbA_{1c}). Образец 12 — кровь взрослого, гомозиготного по β^+-талассемии. (Cossu et al., 1982.)

довых количествах имеется у взрослого. Однако его уровень может заметно возрастать при врожденных или приобретенных заболеваниях, в том числе при талассемии, наследственной персистенции гемоглобина F и лейкемии (Weatherall et al., 1974). Третий важный для диагностики минорный компонент — это HbA_{1c}, т. е. гликозилированный HbA, уровень которого значительно повышается при сахарном диабете (Rahbar, 1968). Точное количественное определение уровня HbA_{1c} представляет большой интерес, поскольку оно может послужить оптимальным способом установления и перманентного контроля за степенью развития гипергликемии (Gabbay, 1976). В 1978 г. было опубликовано не менее четырех работ по разделению и количественному определению HbA и HbA_{1c} с помощью ИЭФ (Schoos et al., 1978; Spicer et al., 1978; Jeppsson et al., 1978; Beccaria et al., 1978). Поскольку различие в значениях pI этих компонентов крайне незначительное, для их фракционирования приходилось дополнительно вводить в гель «разделители», такие, как β-аланин или дипептид His-Gly. Однако и в этом случае расстояние

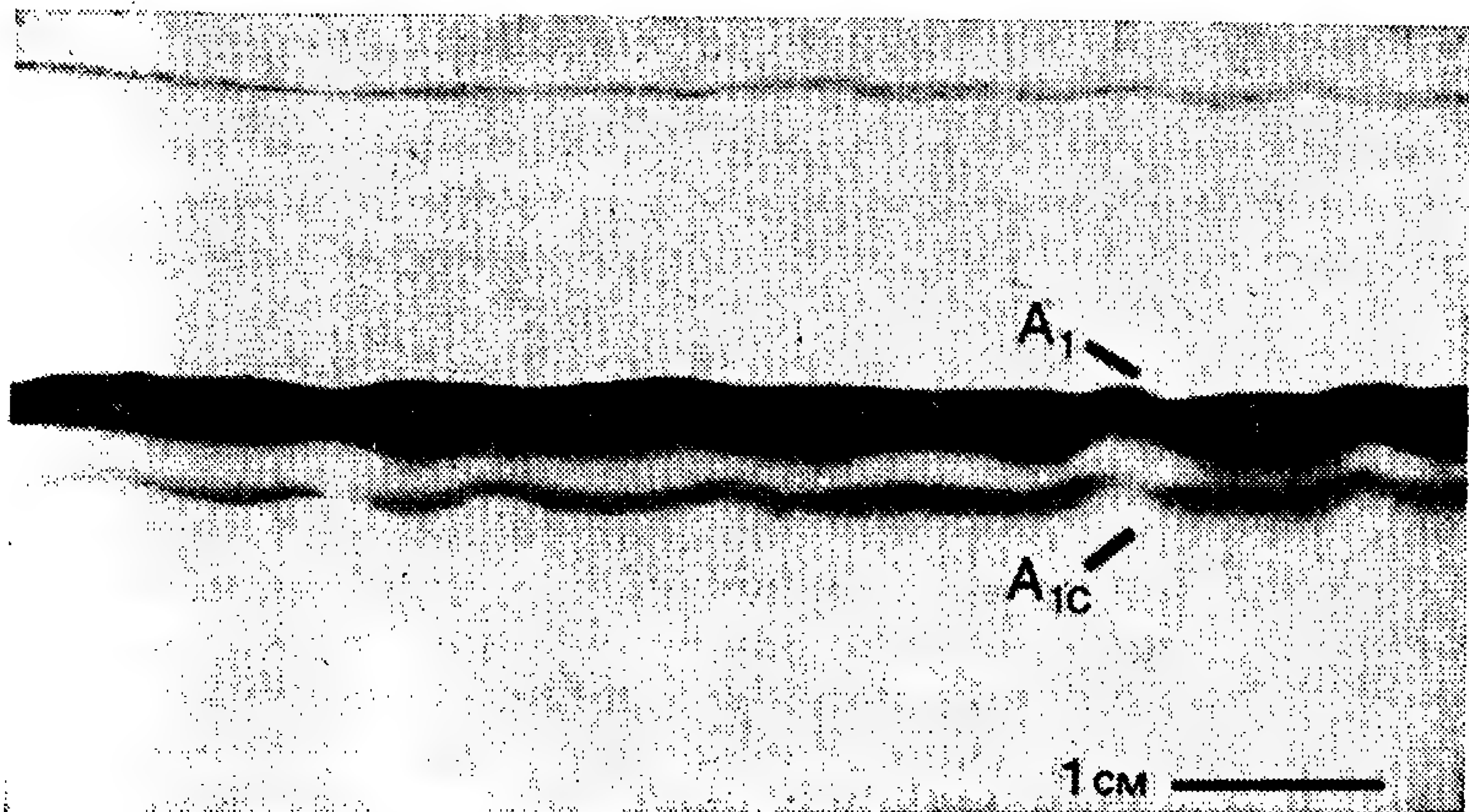


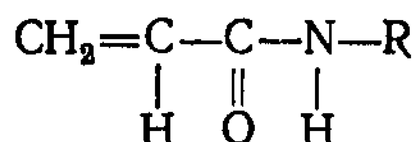
Рис. 5.22. ИЭФ в иммобилизованном градиенте pH (в системе иммобилинов pH 6,5—7,5) гемолизатов, полученных от взрослых, больных сахарным диабетом. Фокусирование проводили в течение ночи при напряжении 200 В/см. При высокой загрузке образцом — около 300 мкг гемоглобина на трек — поперечная диффузия приводит к тому, что белковые полосы из отдельных треков сливаются в одну непрерывную линию. Гель изображен катодной областью вверх. (Из неопубликованных результатов Gianazza, Righetti.)

между двумя соответствующими полосами едва достигало 1 мм, что сильно осложняло их количественное определение с помощью обычных сканирующих денситометров. Значительно более высокое разрешение этих компонентов достигается при ИЭФ в иммобилизованном градиенте pH. Как показано на рис. 5.22, расстояние между полосами составляет несколько миллиметров, и этого уже вполне достаточно для их достоверного денситометрирования.

5.5. Иммобилины с этим справятся!

Вы просто не поверите, как я рад, что эта запутанная история наконец-то близка к завершению. Закончить ее мне бы хотелось, устремив в будущее взгляд, полный светлой надежды. Вам надоели эти «дрейфующие» градиенты pH? Вы расстроены из-за бесконечных флуктуаций в расположении белковых пятен на двумерной карте? Вас раздражают неистребимые «провалы» в электропроводности и буферной емкости? А как вам нравятся эти деформированные волнообразные зоны? Воспряньте духом — иммобилины с этим справятся! Помните, у нас как-то зашел разговор о том, что если с иммобилизованными градиентами pH ничего не выйдет, то вам придется сжечь свой экземпляр книги? Считайте, что вам повезло: этого вам делать не придется. На сегодняшний день в продаже имеется

семь различных компонентов системы иммобилинов (Immobiline®). Значения р*К* этих компонентов в свободном растворе и в составе геля приведены в табл. 5.3. Все эти соединения являются производными акриламида с общей формулой



где в состав радикала R входит карбоксильная группа или третичная аминогруппа. В процессе полимеризации буферные компоненты эффективно встраиваются в гель. Расстояние между двойной связью и буферной функциональной группой достаточно велико — настолько, что влиянием двойной связи на константу диссоциации в исходных мономерах можно пренебречь. Таким образом, различия в значениях р*К* свободных и связанных с матрицей иммобилинов определяются главным образом влиянием самой матрицы. На величины р*К* буферных групп в геле влияют также изменения температуры в ходе ИЭФ. Формирование иммобилизованного градиента pH основано на том же принципе, что и приготовление обычных градиентных полиакриламидных гелей. Для стабилизации нужного градиента концентрации иммобилинов используют поддерживающий градиент плотности (см., например, рис. 3.33, изображающий типичную систему заливки градиентного геля). В случае получения иммобилизованного градиента pH, как правило, лучше использовать не экспоненциальный, а линейный градиент концентрации иммобилинов. Рассмотрим простой пример: образование градиента pH с использованием двух иммобилиновых компонентов — одного буферного и одного небуферного (ионного). В этом случае, рассматривая второй компонент как полностью ионизированный и зная р*К* буферного (первого) компонента и молярное соотношение между компонентами в растворе, значение pH раствора можно рассчитать по уравнению Гендерсона—Хассельбалха. Так, если буферным компонентом является кислота (А), а C_A и C_B — молярные концентрации кислого и оснóвного иммобилинов соответственно, то значение pH будет определяться как

$$\mathrm{pH} = \mathrm{p}K_A + \log \frac{C_B}{C_A - C_B}.$$

В случае буферного основания уравнение примет вид

$$\mathrm{pH} = \mathrm{p}K_B + \log \frac{C_B - C_A}{C_A}.$$

Если концентрация буферного компонента остается неизменной, то при линейном изменении количества нейтрализующего небу-

Таблица 5.3. Свойства иммобилинов[1]. Значения рК[2] ($I = 10^{-2}$)

	H_2O		Полиакриламидный гель[3] T=5%, C=3%		Полиакриламидный гель T=5%, C=3%, 25%-ный глицерин		Агрегатное состояние при комнатной температуре
	10 °C	25 °C	10 °C	25 °C	10 °C	25 °C	
Кислоты с буферными карбоксильными группами							
Иммобилин рK 3,6	3,57	3,58	—	—	3,68±0,02	3,75±0,02	Твердое
Иммобилин рK 4,39	4,39	4,39	4,30±0,02	4,36±0,02	4,40±0,03	4,47±0,03	»
Иммобилин рK 4,6	4,60	4,61	4,51±0,02	4,61±0,02	4,61±0,02	4,71±0,03	»
Основания с буферными третичными аминогруппами							
Иммобилин рK 6,2	6,41	6,23	6,21±0,05	6,15±0,03	6,32±0,08	6,24±0,07	»
Иммобилин рK 7,0	7,12	6,97	7,06±0,07	6,96±0,05	7,08±0,07	6,95±0,06	»
Иммобилин рK 8,5	8,96	8,53	8,50±0,06	8,38±0,06	8,66±0,09	8,45±0,07	Жидкое
Иммобилин рK 9,3	9,64	9,28	9,59±0,08	9,31±0,07	9,57±0,06	9,30±0,05	»

[1]) По Bjellqvist et al., 1982a.
[2]) Значения рK измерены с помощью стеклянного электрода без введения поправок.
[3]) Средние значения, полученные на основании 10 независимых измерений. В случае аминогрупп точность определения рK невысока ввиду медленного ответа электрода.

ферного компонента в системе будет реализоваться градиент pH, соответствующий аналогичному участку кривой титрования буферного иммобилина. Поэтому оптимальным в отношении линейности и буферной емкости будет градиент, центральный участок которого соответствует точке перегиба на кривой титрования (т. е. р*K* буферного компонента). В этом случае при протяженности иммобилизованного градиента в 0,4 ед. pH отклонение от строгой линейности не превысит ±5%. На практике можно пользоваться и подобными градиентами протяженностью до 1,2 ед. pH, при условии совпадения pH в центре градиента с р*K* буферного компонента. Однако в этом случае по краям градиента pH будут наблюдаться определенные отклонения от линейности. Если же мы будем линейно изменять концентрацию

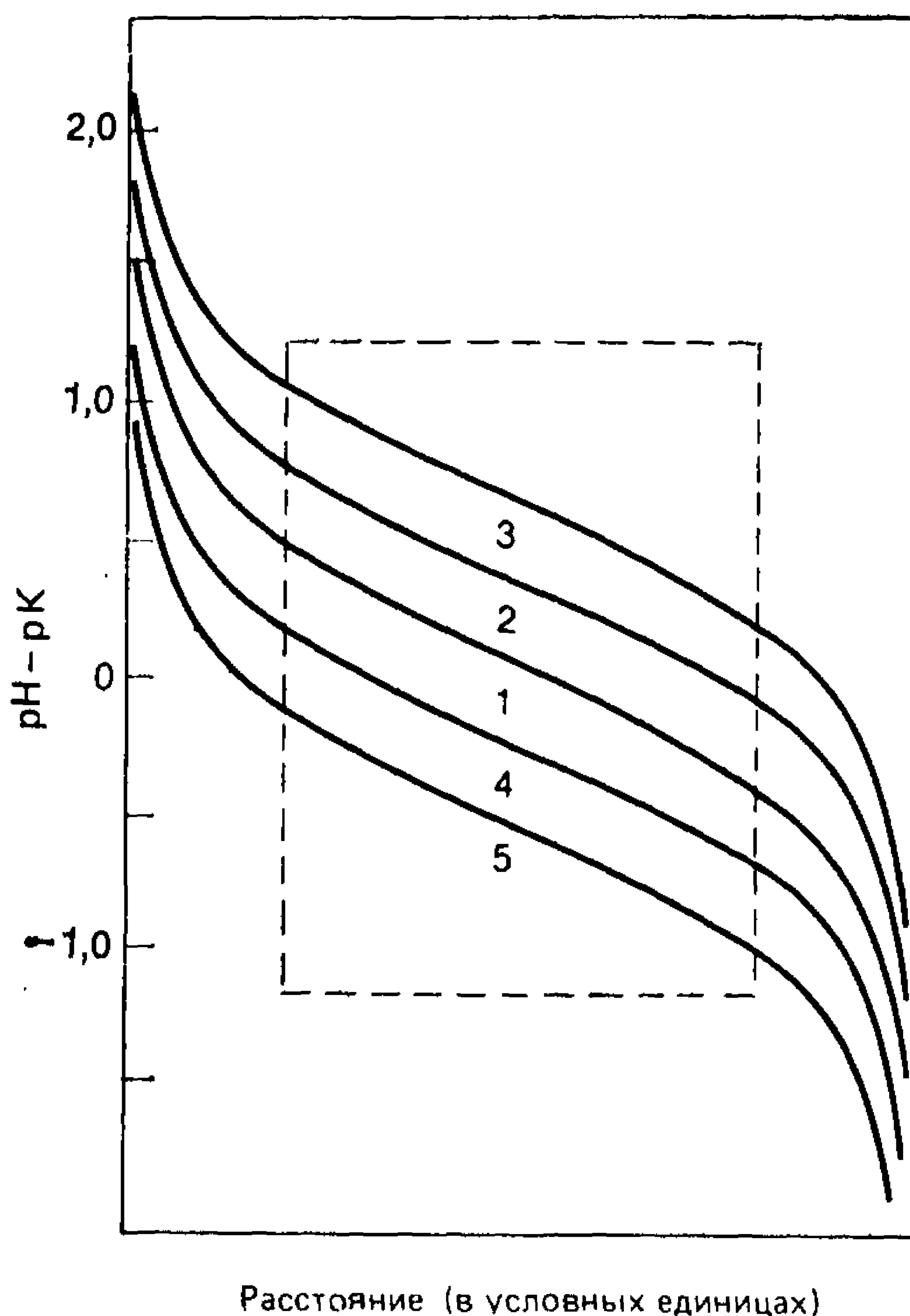


Рис. 5.23. Образование градиентов pH при линейном градиентном смешивании двух иммобилиновых компонентов, один из которых обладает, а другой не обладает буферными свойствами в данной области pH. 1 — кривая титрования, точка перегиба которой совпадает с р*K* буферного иона; 2 — кривая с точкой перегиба, соответствующей значению р*K*+0,3 ед. pH; 3 — кривая с точкой перегиба при pH=р*K*+0,6 ед. pH; 4 — кривая с точкой перегиба при pH=р*K*—0,3 ед. pH; 5— кривая с точкой перегиба при pH=р*K* —0,6 ед. pH. (Bjellqvist et al., 1982.)

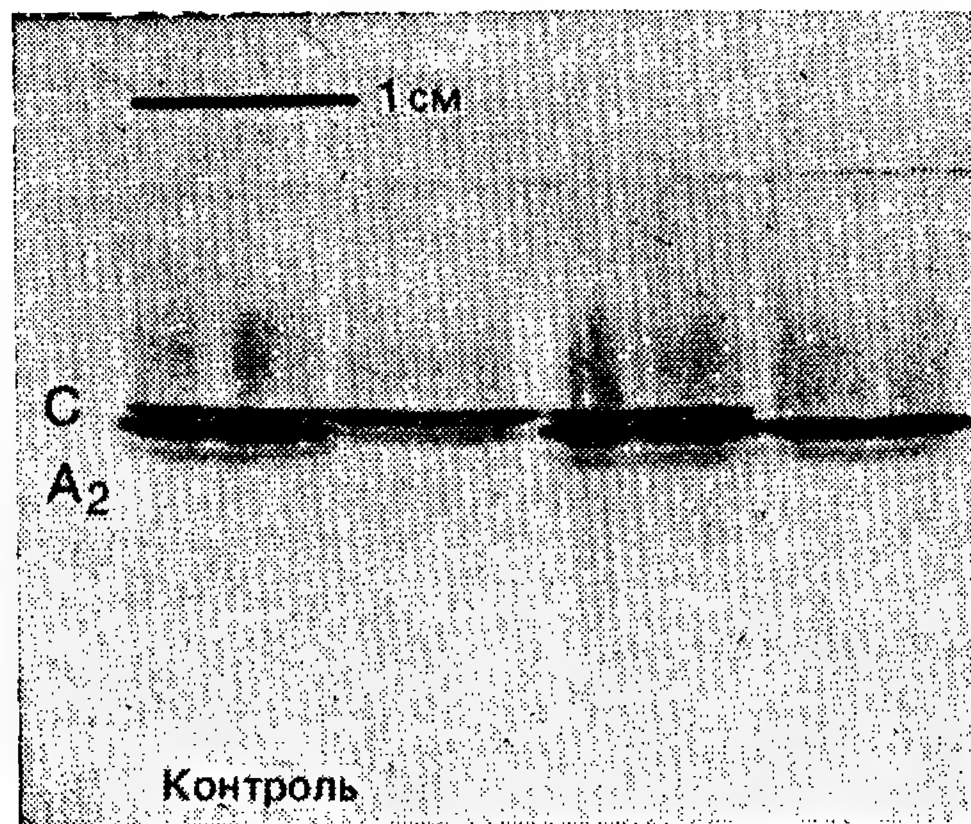




Рис. 5.24. ИЭФ гемоглобинов C и A_2 в обычном градиенте pH 6—9 (*вверху*) и в иммобилизованном градиенте pH 7,7—8,2 в системе иммобилинов (*внизу*). HbC был получен от гомозиготного донора, а HbA_2 был выделен из крови нормального взрослого донора и очищен с помощью хроматографии. В обоих случаях катод расположен сверху. (Неопубликованные результаты Gianazza, Righetti.)

буферного компонента, то точка перегиба на кривой титрования будет смещаться в более кислую или в более щелочную область, т. е. в направлении достижения нового положения эквивалентности. В этом случае мы получим семейство параллельных кривых титрования со смещением вдоль оси pH, достигающим 1,2 ед. pH, при сохранении приемлемых диапазонов линейности (соответствующая рабочая область на рис. 5.23 заключена в рамку).

Каким же образом все это осуществляется на практике? Допустим, что вы хотите сфокусировать гемоглобины. В этом слу-

чае лучше всего выбрать иммобилин р*K* 7.0 и приготовить тяжелый и легкий градиентные растворы, содержащие этот буферный компонент в концентрации 10 мМ. Затем с помощью небуферного компонента (например, иммобилина р*K* 3,6) оттитровать тяжелый градиентный раствор до рН 6,6, а легкий — до рН 7,6. После этого форму для полимеризации заполняют линейным градиентом плотности (и соответственно рН). Заполимеризованный гель будет содержать иммобилизованный, практически линейный градиент рН в интервале рН 6,6—7,6 (идеальные условия для разделения большинства гемоглобиновых компонентов; см. рис. 5.12). В отличие от градиентов Свенссона этот градиент образуется не под действием электрического поля, а формируется предварительно. Однако в отличие от градиентов Колина при пропускании тока этот градиент сколь угодно долго остается неизменным. (Кстати, не забудьте пометить полярность приготовленного геля, чтобы затем с уверенностью поместить анод со стороны кислых значений рН, а катод — со стороны щелочных.)

Итак, мы снова вернулись к тому, с чего все и начиналось? Можно считать, что 1982 г. ознаменовал второе рождение метода ИЭФ. Смелее же вперед, постарайтесь не упустить свой шанс! P.S.: Приглашаю всех скептиков взглянуть на рис. 5.24, и, я уверен, они заговорят по-другому.

ЛИТЕРАТУРА

Ackers G. K. (1964). Biochemistry, **3**, 723—730.
Ackers G. K. (1967). J. Biol. Chem., **242**, 3237—3241.
Addison G. M., Beamish M. R., Hales C. N., Hodgkins M. R., Jacobs A., Leewellen P. (1972). J. Clin. Pathol., **25**, 326—333.
Ahlgren E., Eriksson K. E., Vesterberg O. (1967). Acta Chem. Scand., **21**, 937—944.
Akedo H., Mori Y., Kobayashi M., Okada M. (1972). Biochem. Biophys. Res. Commun., **49**, 107—113.
Albanese A. A. (1940). J. Biol. Chem., **134**, 467—471.
Albertsson P. A. (1960). The Partitioning of Cell Particles and Macromolecules, Academic Press, New York.
Alexander A., Cullen B., Emigholz K., Norgard M. V., Monahan J. J. (1980). Anal. Biochem., **103**, 176—183.
Allen J. C., Humphries C. (1975). In: Isoelectric Focusing; Arbuthnott J. P. and Beeley J. A., eds. (Butterworths, London), pp. 347—354.
Allen R. G., Maurer H. R. (eds.). (1974). Electrophoresis and Isoelectric Focusing in Polyacrylamide Gel (de Gruyter, Berlin).
Allen R. C. (1978). J. Chromatogr, **146**, 1—32.
Allen R. C. (1980). Electrophoresis, **1**, 32—37.
Allen R. C., Arnaud P. (eds.). (1981). Electrophoresis'81 (de Gruyter, Berlin).
Almgren M. (1971). Chem. Scripta, **1**, 69—75.
Alper C. A., Hobart M. J., Lachmann P. J. (1975). In: Isoelectric Focusing; Arbuthnott J. P., Beeley J. A., eds. (Butterworths, London), pp. 306—312.
Alpert E., Drysdale J. W., Isselbacher K. J., Schur P. H. (1972). J. Biol. Chem., **247**, 3792—3798.
Altland K. (1977). In: Electrofocusing and Isotachophoresis; Radola B. J. and Graesslin D., eds. (de Gruyter, Berlin), pp. 295—301.
Atland K., Kaempfer M. (1980). Electrophoresis, **1**, 57—62.
Ambler J. (1978a). Clin. Chim. Acta, **85**, 183—191.
Ambler J. (1978b). Clin. Chim. Acta, **88**, 63—70.
Ambler J., Walker G. (1979). Clin. Chem., **25**, 1320—1322.
Ames G. F. L., Nikaido K. (1976). Biochemistry, **15**, 616—623.
An der Laan B., Chrambach A. (1980). Electrophoresis, **1**, 23—27.
Andersson L. O., Borg H., Mikaelson M. (1972). FEBS Lett., **20**, 199—202.
Anderson N. G., Anderson N. L. (1977). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **74**, 5421—5426.
Anderson N. G., Anderson N. L. (1978a). Anal. Biochem., **85**, 331—340.
Anderson N. G., Anderson N. L. (1978b). Anal. Biochem., **85**, 341—354.
Anderson N. L., Hickman B. J. (1979). Anal. Biochem., **93**, 312—320.
Anderson N. L. (1981). In: Electrophoresis '81; Allen R. C. and Arnaud P., eds. (de Gruyter, Berlin), pp. 309—316.
Anker H. S. (1970). FEBS Lett., **7**, 293—296.
Ansorge W., De Mayer L. (1980). J. Chromatogr., **202**, 45—53.
Araki C. (1956). Bull. Chem. Soc. Jpn., **29**, 543—544.
Arbuthnott J. P., Beeley J. A. (eds.) (1975). Isoelectric Focusing (Butterworths, London).
Arnaud P., Wilson G. B., Koistinen J., Fudenberg H. (1977). J. Immunol. Methods, **16**, 221—231.

Arnott S., Fulmer A., Scott W. E., Dea I. C. M., Moorhouse R., Rees D. A. (1974). J. Mol. Biol., **90**, 269—284.
Arosio P., Yokota M., Drysdale J. W. (1976). Cancer Res., **36**, 1735—1739.
Arosio P., Yokota M., Drysdale J. W. (1977). Br. J. Haematol, **36**, 201—209.
Arosio P., Gianazza E., Righetti P. G. (1978a). J. Chromatogr, **166**, 55—64.
Arosio P., Adelman T. G., Drysdale J. W. (1978b). J. Biol. Chem., **253**, 4451—4458.
Arvidson S., Wadström T. (1973). Biochim. Biophys. Acta, **310**, 418—420.
Awdeh Z. L., Williamson A. R., Askonas B. A. (1968). Nature, **219**, 66—67.
Awdeh Z. L. (1969). Sci. Tools, **16**, 42—43.
Azuma J. I., Kashimura N., Komano T. (1977). Anal. Biochem., **81**, 454—457.
Bagshaw J. C., Drysdale J. W., Malt R. A. (1973). Ann N. Y. Acad. Sci., **209**, 363—371.
Ballou B., Sundharadas G., Bach M. L. (1974). Science, **185**, 531—532.
Banyard S. H., Stammers D. K., Harrison P. M. (1978). Nature, **271**, 282—284.
Barger B. O., White F. C., Pace J. L., Kemper D. L., Ragland W. L. (1976). Anal. Biochem., **70**, 327—335.
Bark J. E., Harris M. J., Firth M. (1976). J. Forensic Sci. Soc., **16**, 115—120.
Barrett T., Gould H. J. (1973). Biochim. Biophys. Acta, **294**, 165—170.
Barrollier V. J., Watzke E., Gibian H. (1958). Z. Naturforsch., **136**, 754—755.
Bassett P., Beuzard Y., Garel M. C., Rosa J. (1978). Blood, **51**, 971—980.
Bassett P., Braconnier F., Rosa J. (1982). J. Chromatogr., **227**, 267—304.
Baumann G., Chrambach A. (1975). Anal Biochem., **64**, 530—536.
Beccaria L., Chiumello G., Gianazza E., Luppis B., Righetti P. G. (1978). Am. J. Haematol., **4**, 367—374.
Beeley J. A., Stevenson S. M., Beeley J. G. (1972). Biochim. Biophys. Acta, **285**, 293—300.
Behnke J. N., Dagher S. M., Massey T. H., Deal W. C., Jr. (1975). Anal. Biochem., **69**, 1—9.
Bengtsson G., Olivecrona T. (1977). In: Isoelectric Focusing and Isotachophoresis; Radola B. J., Graesslin D., eds. (De Gruyter, Berlin), pp. 189—195.
Beuzard Y., Courvalin J. C., Cohen-Solal M., Garel M. C., Rosa J. (1972). FEBS Lett., **27**, 76—80.
Bhakdi S., Knüfermann H., Wallach D. F. H. (1975). In: Progress in Isoelectric Focusing and Isotachophoresis; Righetti P. G., ed. (Elsevier, Amsterdam), pp. 281—291.
Bianchi Bosisio A., Loehrlein C., Snyder R. S., Righetti P. G. (1980). J. Chromatogr., **189**, 317—330.
Bianchi Bosisio A., Snyder R. S., Righetti P. G. (1981). J. Chromatogr., **209**, 265—272.
Bianchi U., Stefanelli A. (1970). Atti Accad. Naz. Lincei, Rend. Ser. VIII, **93**, 539—542.
Bibring T., Baxandall J. (1978). Anal. Biochem., **85**, 1—14.
Bier M., Egen N. B. (1979). In: Electrofocus/78; Haglund H., Westerfeld J. C., Ball Jr., J. T., eds. (Elsevier, Amsterdam), pp. 35—48.
Bier M., Egen N. B., Allgyer T. T., Twitty G. E., Mosher R. A. (1979). In: Peptides: Structure and Biological Function; Gross E., Meienhofer J., eds. (Pierce Chemical Co., Rockford, Il), pp. 79—89.
Bier M., Mosher R. A., Palusinski O. A. (1981). J. Chromatogr., **211**, 313—335.
Binion S., Rodkey L. S. (1981). Anal. Biochem., **112**, 362—366.
Biscoglio de Jimenez Bonino M. J., Cascone O., Arnao de Nué A. I., Santomé J. A., Sanchez D., Oré R., Villavicencio M. (1981). Int. J. Peptide Protein Res., **17**, 374—379.
Bishop R. (1979). Sci. Tools, **26**, 2—8.

Bjellqvist B., Ek K., Righetti P. G., Gianazza E., Görg A., Postel W. (1982a). In: Electrophoresis '82; Stathakos D., ed. (de Gruyter, Berlin), in press.
Bjellqvist B., Ek K., Righetti P. G., Gianazza E., Görg A., Postel W., Westermeier R. (1982b). J. Biochem. Biophys. Methods., **6**, 317—339.
Blakesley R. W., Boezi J. A. (1977). Anal. Biochem., **82**, 580—582.
Blanicky P., Pihar O. (1972). Coll. Czech. Chem. Commun., **37**, 319—325.
Bloomster T. G., Watson D. W. (1981). Anal. Biochem., **113**, 79—84.
Bobb D. (1973). Ann. N. Y. Acad. Sci., **209**, 225—236.
Boddin M., Hilderson J., Lagrou A., Dierick W. (1975). Anal. Biochem., **64**, 293—296.
Bode H. J. (1980). In: Electrophoresis '79; Radola B. J., ed. (de Gruyter, Berlin), pp. 39—52.
Bodwell C. E., Creed G. J. (1973). Abstr. 9th Int. Congress Biochem. Stockholm, p. 25.
Boltz Jr. R. C., Todd P., Hammerstedt R. H., Hymer W. C., Thomson S. J., Docherty J. (1977). In: Cell Separation Methods; Bloemendal H., ed. (North Holland, Amsterdam), pp. 145—155.
Boltz Jr. R. C., Miller T. Y., Todd P., Kukulinsky N. E. (1978). In: Electrophoresis '78; Catsimpoolas N., ed. (Elsevier, Amsterdam), pp. 345—355.
Boltz Jr. R. C., Todd P. (1979). In: Electrokinetic Separation Methods; Righetti P. G., Van Oss C. J., Vanderhoff J. W., eds. (Elsevier, Amsterdam), pp. 229—250.
Bonitati J. (1980). J. Biochem. Biophys. Methods, **2**, 341—356.
Bonitati J. (1981). J. Biochem. Biophys. Methods, **4**, 49—69.
Bosshard H. F., Datyner A. (1977). Anal. Biochem., **82**, 327—333.
Bossinger J., Miller M. J., Vo K. P., Geiduschek E. P., Xuong N. H. (1979). J. Biol. Chem., **254**, 7986—7998.
Boulikas J., Hancock R. (1981). J. Biochem. Biophys. Methods, **5**, 219—228.
Bours J. (1973a). Exp. Eye Res., **15**, 299—319.
Bours J. (1973b). Exp. Eye Res., **16**, 487—499.
Bours J. (1973c). Exp. Eye Res., **16**, 501—515.
Bours J. (1973d). Sci. Tools, **20**, 29—34.
Bours J. (1973e). Sci. Tools, **20**, 2—14.
Bours J. (1976). In: Isoelectric Focusing; Catsimpoolas N., ed. (Academic Press, New York), pp. 209—228.
Boussios T., Bertles J. F. (1978). In: Electrophoresis '78; Catsimpoolas N., ed. (Elsevier, Amsterdam), pp. 137—144.
Boyd J. B., Mitchell H. K. (1965). Anal. Biochem., **13**, 28—35.
Brackenridge C. J., Bachelard H. S. (1969). J. Chromatogr., **41**, 242—249.
Bradbury R. (1953). Fahrenheit 451, Ballantine Books, New York.
Bradley T. B., Wohl R. C., Rieder R. F. (1967). Science, **157**, 1581—1583.
Brakke M. D., Allington R. W., Langille F. A. (1968). Anal. Biochem., **25**, 30—39.
Brenna O., Gianazza E., Righetti P. G. (1982). J. Chromatogr., **237**, 293—296
Brewer J. M. (1967). Science, **156**, 256—257.
Brinkmann B., Koops E., Klopp O., Heindl K., Rüdiger H. W. (1972). Ann. Hum. Genet., **35**, 363—366.
Brogren C. H. (1977). In: Electrofocusing and Isotachophoresis; Radola B. J., Graesslin D., eds. (de Gruyter, Berlin), pp. 549—558.
Brown W. D., Green S. (1970). Anal. Biochem., **34**, 593—595.
Brown R. K., Lull J. M., Lowenkron S., Bagshaw J. C., Vinogradov S. N. (1976). Anal. Biochem., **71**, 325—332.
Brown R. K., Caspers M. L., Lull J. M., Vinogradov S. N., Felgenhauer K., Nekic M. (1977). J. Chromatogr., **131**, 223—232.
Bryce C. F. A., Crichton R. R. (1971). J. Biol. Chem., **246**, 4198—4205.
Bull H. B. (1971). An Introduction to Physical Biochemistry, F. A. Davis Co., Philadelphia, pp. 127—135.

Bunn H. F., Drysdale J. W. (1971). Biochim. Biophys. Acta, **229**, 51—57.
Bunn H. F., McDonough M. (1974). Biochemistry, **13**, 988—993.
Bunn H. F., Forget B. G., Ranney H. M. (1977). Hemoglobinopathies, Saunders, Philadelphia.
Bunn H. F. (1977). In: Biological and Biomedical Applications of Isoelectric Focusing; Catsimpoolas N., Drysdale J. W., eds. (Plenum Press, New York), pp. 29—55.
Burdett P., Lizana J., Eneroth P., Bremme K. (1981). In: Electrophoresis '81; Allen R. C., Arnaud P., eds. (de Gruyter, Berlin), pp. 329—342.
Burghes A. H. M., Dunn M. J., Statham H. F., Dubowitz V. (1981). In: Electrophoresis '81; Allen R. C., Arnaud P., eds. (de Gruyter, Berlin), pp. 295—308.
Burridge K. (1978). In: Methods in Enzymology; Ginsburg V., ed. (Academic Press, New York), pp. 54—60.
Bustos S. E., Fung L. (1981). In: Electrophoresis '81; Allen R. C., Arnaud P., eds. (de Gruyter, Berlin), pp. 317—328.
Butler J. A. V., Stephen J. M. L. (1947). Nature, **160**, 469—471.
Callaham M. F., Poe W. E., Heitz J. R. (1976). Anal. Biochem., **70**, 542—546.
Cann J. R. (1966). Biochemistry, **5**, 1108—1112.
Cann J. R., Stimpson D. I. (1977). Biophys. Chem., **7**, 103—114.
Cann J. R., Stimpson D. I., Cox D. J. (1978). Anal. Biochem., **85**, 34—49.
Cann J. R. (1979). In: Electrokinetic Separation Methods; Righetti P. G., Van Oss C. J., Vanderhoff J. W., eds. (Elsevier, Amsterdam), pp. 369—387.
Cantrell S. J., Babitch J. A., Torres S. (1981). Anal. Biochem., **116**, 168—173.
Capel M., Redman B., Bourque D. P. (1979). Anal. Biochem., **97**, 210—228.
Carrel S., Theifkaes L., Skvaril S., Barandun S. (1969). J. Chromatorg., **45**, 483—486.
Carter N. D., Auton J. A., Welch S. G., Marshall W. H., Fraser G. R. (1976). Hum. Hered., **26**, 4—7.
Casassa E. F. (1976). J. Polymer Sci., **B5**, 773—780.
Caspers M. L., Rosey Y., Brown R. K. (1977). Anal. Biochem., **79**, 166—180.
Caspers M. L., Chrambach A. (1977). Anal. Biochem., **81**, 54—62.
Catsimpoolas N. (1969a). Anal. Biochem., **26**, 480—482.
Catsimpoolas N. (1969b). Clin. Chim. Acta, **23**, 237—238.
Catsimpoolas N., Meyer E. W. (1969). Arch. Biochem. Biophys., **132**, 279—285.
Catsimpoolas N. (1970). Separ. Sci., **5**, 523—544.
Catsimpoolas N. (ed.). (1973a). Isoelectric Focusing and Isotachophoresis, Ann. N. Y. Acad. Sci., 209.
Catsimpoolas N. (1973b). Separ. Sci., **8**, 71—121.
Catsimpoolas N. (1973c). Ann. N. Y. Acad. Sci., **209**, 65—79.
Catsimpoolas N. (1973d). Anal. Biochem., **54**, 66—78.
Catsimpoolas N. (1973e). Anal. Biochem., **54**, 79—87.
Catsimpoolas N. (1973f). Anal. Biochem., **54**, 88—94.
Catsimpoolas N., Griffith A. (1973). Anal. Biochem., **56**, 100—120.
Catsimpoolas N. (1975a). Separ. Sci., **10**, 55—76.
Catsimpoolas N. (1975b). In: Progress in Isoelectric Focusing and Isotachophoresis; Righetti P. G., ed.(Elsevier, Amsterdam), pp. 77—92.
Catsimpoolas N. (ed.). (1976). Isoelectric Focusing, Academic Press, New York.
Catsimpoolas N., Drysdale J. W. (eds.). (1977). Biological and Biomedical Applications of Isoelectric Focusing, Plenum Press, New York.
Catsimpoolas N., Griffith A. (1977). In: Electrofocusing and Isotachophoresis; Radola B. J., Graesslin D., eds. (de Gruyter, Berlin), pp. 469—479.
Catsimpoolas N. (ed.). (1978). Electrophoresis'78, Elsevier, Amsterdam.
Catsimpoolas N., Stamatopoulou A., Griffith A. L. (1980). In: Electrophoresis'79; Radola B. J., ed. (de Gruyter, Berlin), pp. 503—515.

Chamberlain J. P. (1979). Anal. Biochem., **98**, 132—140.
Chamoles N., Karcher D. (1970a). Clin. Chim. Acta, **30**, 337—341.
Chamoles N., Karcher D. (1970b). Clin. Chim. Acta, **30**, 359—364.
Chapuis-Cellier C., Francina A., Arnaud P. (1980). Prot. Biol. Fluids, **27**, 743—746.
Chapuis-Cellier C., Arnaud P. (1981). Anal. Biochem., **113**, 325—331.
Charlionet R., Martin J. P., Sesboüé R., Madec P. J., Lefebvre F. (1979). J. Chromatogr., **176**, 89—101.
Charlionet R., Morcamp C., Sesboüé R., Martin J. P. (1981). J. Chromatogr., **205**, 355—366.
Chidakel B. E., Nguyen N. Y., Chrambach A. (1977). Anal. Biochem., **77**, 216—225.
Chilla R., Doering K. M., Domagk G. F., Rippa M. (1973). Arch. Biochem. Biophys., **159**, 235—239.
Chlumechka V., D'Obrenen P., Colter J. S. (1973). Canad. J. Biochem., **51**, 1521—1530.
Choo K. H., Cotton R. G. H., Danks D. M. (1980). Anal. Biochem., **103**, 33—38.
Chrambach A. (1966). Anal. Biochem., **15**, 544—552.
Chrambach A., Rodbard D. (1971). Science, **172**, 440—451.
Chrambach A., Rodbard D. (1972). Separ. Sci., **7**, 663—703.
Chrambach A., Doerr P., Finlayson G. R., Miles L. E. M., Sherins R., Rodbard D. (1973). Ann. N. Y. Acad. Sci., **209**, 44—64.
Chrambach A., Jovin T. M., Svendsen P. J., Rodbard D. (1976). In: Methods of Protein Separation, vol. 2; Catsimpoolas N., ed. (Plenum Press, New York), pp. 27—144.
Chrambach A., Nguyen N. Y. (1979). In: Electrokinetic Separation Methods; Righetti P. G., Van Oss C. J., Vanderhoff J. W., eds. (Elsevier, Amsterdam), pp. 337—368.
Chrambach A. (1980). Mol. Cell Biochem., **29**, 23—46.
Christensen J. J., Hill J. O., Izatt M. R. (1971). Science, **174**, 459—467.
Chuat J. C., Pilon C. (1977). Anal. Biochem., **82**, 258—261.
Cleland W. W. (1964). Biochemistry, **3**, 480—482.
Comi P., Giglioni B., Ottolenghi S., Gianni A. M., Ricco G., Mazza U., Saglio G., Camaschella C., Pich P. G., Gianazza E., Righetti P. G. (1979). Biochem. Biophys. Res., Commun., **87**, 1—8.
Consden R., Gordon A. H., Martin A. J. P. (1946). Biochem. J., **40**, 33—40.
Constans J., Viau M., Gouaillard C., Bouisson C., Clerc A. (1980). In: Electrophoresis '79; Radola B. J., ed. (de Gruyter, Berlin), pp. 701—710.
Conway-Jacobs A., Lewin L. M. (1971). Anal. Biochem., **43**, 394—400.
Cossu G., Manca M., Gavina P. M., Bullitta R., Bianchi Bosisio A., Gianazza E., Righetti P. G. (1982). Am. J. Haematol., **13**, 149—157.
Cotton R. G. H., Milstein C. (1973). J. Chromatogr., **86**, 219—221.
Coutelle R. (1971). Acta Biol. Med. Germ., 27, 681—691.
Cox J. L., King H., Berg C. P. (1929). J. Biol. Chem., **81**, 755—762.
Creighton T. E. (1979). J. Mol. Biol., **129**, 235—264.
Crowle A. J., Cline L. J. (1977). J. Immunol. Methods, **17**, 379—385.
Czempiel W. (1977). In: Electrofocusing and Isotachophoresis; Radola B. J., Graesslin D., eds. (de Gruyter, Berlin), pp. 405—412.
Dahlberg A. E., Dingman C. W., Peacock A. C. (1969). J. Mol. Biol., **41**, 139—150.
Dale G., Latner A. L. (1968). Lancet (April), **20**, 847—848.
Dale G., Latner A. L. (1969). Clin. Chim. Acta, **24**, 61—68.
Danno G. I. (1977). Anal. Biochem., **83**, 189—193.
Datyner A., Finnimore E. (1973). Anal. Biochem., **52**, 45—55.
Davies H. (1970). Prot. Biol. Fluids, **17**, 389—396.
Davies H. (1975). In: Isoelectric Focusing; Arbuthnott J. P., Beeley J. A., eds. (Butterworths, London), pp. 97—113.

Davis B. J. (1964). Ann. N. Y. Acad. Sci., **121**, 404—427.
Dean B. (1979). Anal. Biochem., **99**, 105—111.
Dean R. T., Messer M. (1975). J. Chromatogr., **105**, 353—358.
Delincée H., Radola B. J. (1970). Biochim. Biophys. Acta, **200**, 404—407.
Delincée H., Radola B. J. (1971). Prot. Biol. Fluids, **18**, 493—497.
Delincée H., Radola B. J. (1975). Int. J. Radiat. Biol., **28**, 565—579.
Delincée H., Radola B. J. (1978). Anal. Biochem., **90**, 609—623.
Delincée H. (1980). In: Electrophoresis '79; Radola B. J., ed. (de Gruyter, Berlin), pp. 165—171.
Denckla W. D. (1974). J. Clin. Invest., **53**, 572—581.
Denckla W. D. (1975). U. S. Patent, 3, 901, 780.
Denckla W. D. (1976). U. S. Patent, 3, 951, 777.
Denckla W. D. (1977). In: Electrofocusing and Isotachophoresis; Radola B. J., Graesslin D., eds. (de Gruyter, Berlin), pp. 423—432.
De Olmos J. (1969). Brain Behav. Evol., **2**, 213—237.
Dewar J. H., Latner A. L. (1970). Clin. Chim. Acta, **28**, 149—152.
Diezel W., Kopperschläger G., Hofmann E. (1972). Anal. Biochem., **48**, 617—620.
Dirksen M. L., Chrambach A. (1972). Separ. Sci., **7**, 747—772.
Doi E., Ohtsuru C. (1974). Agr. Biol. Chem., **38**, 1747—1748.
Domagk G. F., Doering K. M., Chilla R. (1973). Eur. J. Biochem., **38**, 259—264.
Domagk G. F., Alexander W. R., Doering K. M. (1974). Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **355**, 781—786.
Douzou P. (1977). Cryobiochemistry, Academic Press, New York.
Drysdale J. W. (1970). Biochim. Biophys. Acta, **207**, 256—258.
Drysdale J. W., Righetti P. G., Bunn H. F. (1971). Biochim. Biophys. Acta, **229**, 42—53.
Drysdale J. W., Righetti P. G. (1972). Biochemistry, **11**, 4044—4052.
Drysdale J. W. (1974). Biochem. J., **141**, 627—632.
Drysdale J. W., Shafritz D. (1975). In: Progress in Isoelectric Focusing and Isotachophoresis; Righetti R. G., ed. (Elsevier, Amsterdam), pp. 293—306.
Drysdale J. W. (1977a). In: Electrofocusing and Isotachophoresis; Radola B. J., Graesslin D., eds. (de Gruyter, Berlin), pp. 241—252.
Drysdale J. W. (1977b). In: Ciba Foundation Symposium 51 (Elsevier, Amsterdam), pp. 241—252.
Drysdale J. W. (1979). In: Carcino-Embrionic Proteins; Lehman F. G., ed. Vol. 1 (Elsevier, Amsterdam), pp. 249—259.
Drzeniek R., Reichel C., Wiegers K. J., Hamann A., Hilbring M. (1980). In: Electrophoresis '79; Radola B. J., ed. (de Gruyter, Berlin), pp. 475—492.
Dubernet M., Riberau-Gayon P. (1974). Phytochemistry, **13**, 1085—1087.
Duckworth M., Yaphe W. (1971). Anal. Biochem., **44**, 636—641.
Du Cros D. L., Wrigley C. W. (1979). J. Sci. Food Agric., **30**, 785—794.
Dunford H. R., Stillman J. S. (1976). Coord. Chem. Rev., **19**, 187—193.
Du Vigneaud V., Irwing G. W., Dyer H. M., Sealock R. R. (1938). J. Biol. Chem., **123**, 45—55.
Earland C., Ramsden D. B. (1969). J. Chromatorg., **41**, 259—261.
Edwards Y. H., Potter J. E., Hopkinson D. A. (1979). Ann. Human. Genet., **42**, 293—302.
Edwards J. J., Hahn H. J., Anderson N. G. (1980). In: Electrophoresis '79; Radola B. J., ed. (de Gruyter, Berlin), pp. 383—394.
Edwards J. J., Anderson N. G. (1981). Electrophoresis, **3**, 161—168.
Egen N. B., Twitty G. E., Bier M. (1979). 17th Aerospace Sciences Meeting, New Orleans, LA, Jan. 15—17, document 79—0405.
Ek K., Righetti P. G. (1980). Electrophoresis, **1**, 137—140.

Ek K., Gianazza E., Righetti P. G. (1980). Biochim. Biophys. Acta, **626**, 356—365.
Ek K. (1981). LKB Application Note No. 319, June 1981.
Elliott R. W., Hohman C., Romejko C., Louis P., Lilly F. (1978). In: Electrophoresis '78; Catsimpoolas N., ed. (Elsevier, Amsterdam), pp. 261—274.
Emond J. P., Pagé M. (1980). J. Chromatogr., **200**, 57—63.
Engel M. R. (1888). Bull. Soc. Chim. Paris, **50**, 102—110.
Epstein C. J., Schechter A. N. (1968). Ann. N. Y. Acad. Sci., **151**, 85—101.
Eriksson K. E., Pettersson B. (1973). Anal. Biochem., **56**, 618—620.
Esen A. (1981). In: Electrophoresis '81; Allen R. C., Arnaud P., eds. (de Gruyter, Berlin), pp. 73—76.
Fahnestock S., Erdmann U., Nomura M. (1973). Biochemistry, **12**, 220—224.
Fairbanks G., Steck T. L., Wallach D. L. H. (1971). Biochemistry, **10**, 2026—2032.
Fantes K. H., Furminger I. G. S. (1967). Nature, **215**, 750—751.
Faupel M., Von Arx E. (1978). J. Chromatogr., **157**, 243—251.
Fawcett J. S., Morris C. J. O. R. (1966). Separ. Sci., **1**, 9—20.
Fawcett J. S. (1968). FEBS Lett., **1**, 81—82.
Fawcett J. S. (1970). Prot. Biol. Fluids, **17**, 409—412.
Fawcett J. S. (1973). Ann. N. Y. Acad. Sci., **209**, 112—126.
Fawcett J. S. (1975a). In: Progress in Isoelectric Focusing and Isotachophoresis; Righetti P. G., ed. (Elsevier, Amsterdam), pp. 25—37.
Fawcett J. S. (1975b). In: Isoelectric Focusing; Arbuthnott J. P., Beeley J. A., eds. (Butterworths, London), pp. 23—43.
Fawcett J. S. (1976). In: Isoelectric Focusing; Catsimpoolas N., ed. (Academic Press, New York), pp. 173—208.
Felgenhauer K., Pak S. J. (1973). Ann. N. Y. Acad. Sci., **209**, 147—153.
Felgenhauer K. (1974). Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **355**, 1281—1290.
Felgenhauer K., Pak S. J. (1975). In: Progress in Isoelectric Focusing and Isotachophoresis; Righetti P. G., ed. (Elsevier, Amsterdam), pp. 115—120.
Ferris T. (1979). The Red Limit, Corgi Books, Great Britain, pp. 23—25.
Finlayson G. R., Chrambach A. (1971). Anal. Biochem., **40**, 292—311.
Fischer L. (1969). An Introduction to Gel Chromatography, North Holland Amsterdam.
Fisher R. A., Edwards Y. H., Putt W., Potter J., Hopkinson D. A. (1977). Ann. Hum. Genet., **41**, 139—149.
Flatmark T., Vesterberg O. (1966). Acta Chem. Scand., **20**, 1497—1503.
Flodin P., Kupke P. W. (1956). Biochim. Biophys. Acta, **21**, 368—375.
Flodin P. (1961). J. Chromatogr., **5**, 103—111.
Foster G. L., Schmidt C. L. A. (1926). J. Am. Chem. Soc., **48**, 1709—1713.
Francina A., Dorleac E., Cloppet H. (1981). J. Chromatogr., **222**, 116—119.
Frater R. (1970). J. Chromatogr., **50**, 469—474.
Fredriksson S. (1972). Anal. Biochem., **50**, 575—585.
Fredriksson S., Pettersson S. (1974). Acta Chem. Scand., **28**, 370.
Fredriksson S. (1975). J. Chromatogr., **108**, 153—167.
Fredriksson S. (1977a). J. Chromatogr., **135**, 441—446.
Fredriksson S. (1977b). In: Electrofocusing and Isotachophoresis; Radola B. J., Graesslin D., eds. (de Gruyter, Berlin), pp. 71—83.
Fredriksson S. (1978). J. Chromatogr., **151**, 347—355.
Friesen J. D., Parker J., Watson R. J., Bendiak D., Reeh S. V., Pedersen S. (1976). Mol. Gen. Genet., **148**, 93—98.
Fries E. (1976). Anal. Biochem., **70**, 124—135.
Funatsu M., Hara K., Ishguro M., Funatsu G., Kubo K. (1973). Proc. Jpn. Acad., **49**, 771—776.
Gabbay K. H. (1976). N. Engl. J. Med., **295**, 443—447.
Gabriel O. (1971). In: Methods in Enzymology; Colowick S. P., Kaplan N. O., eds. (Academic Press, New York), **22**, 578—590.

Gacon G., Krishnamoorthy R., Wajcman H., Labie D., Tapon J., Cosson A. (1977a). Biochim. Biophys. Acta, **490**, 156—163.
Gacon G., Belkhodja O., Wajcman H., Labie D. (1977b). FEBS Lett., **82**, 243—246.
Gainer H. (1971). Anal. Biochem., **44**, 589—605.
Gainer H. (1973). Anal. Biochem., **51**, 646—650.
Galante E., Caravaggio T., Righetti P. G. (1975). In: Progress in Isoelectric Focusing and Isotachophoresis; Righetti P. G., ed. (Elsevier, Amsterdam), pp. 3—12.
Galante E., Garavaggio T., Righetti P. G. (1976). Biochim. Biophys. Acta, **442**, 309—315.
Garrels J. C. (1979). J. Biol. Chem., **254**, 7961—7977.
Gasparic V., Rosengren A. (1974). Sci. Tools, **21**, 1—2.
Gasparic V., Rosengren A. (1975). In: Isoelectric Focusing; Arbuthnott J. P., Beeley J. A., eds. (Butterworths, London), pp. 178—181.
Gelfi C., Righetti P. G. (1981a). Electrophoresis, **2**, 213—219.
Gelfi C., Righetti P. G. (1981b). Electrophoresis, **2**, 220—228.
Gelsema J. W., De Ligny C. L. (1977). J. Chromatogr., **130**, 41—50.
Gelsema J. W., De Ligny C. L., Van Der Veen N. G. (1977). J. Chromatogr., **140**, 149—155.
Gelsema J. W., De Ligny C. L., Van Der Veen N. G. (1978). J. Chromatogr., **154**, 161—174.
Gelsema J. W., De Ligny C. L. (1979). J. Chromatogr., **178**, 550—554.
Gelsema J. W., De Ligny C. L., Van Der Veen N. G. (1979). J. Chromatogr., **173**, 33—41.
Gelsema J. W., De Ligny C. L., Blanken W. M. (1980a). J. Chromatogr., **198**, 301—316.
Gelsema J. W., De Ligny C. L., Blanken W. M., Hamer R. J., Roozen A. M. P., Bakker J. A. (1980b). J. Chromatogr., **196**, 51—58.
Gianazza E., Pagani M., Luzzana M., Righetti P. G. (1975). J. Chromatogr., **109**, 357—364.
Gianazza E., Righetti P. G., Bordi S., Papeschi G. (1977). In: Electrofocusing and Isotachophoresis; Radola B. J., Graesslin D., eds. (de Gruyter, Berlin), pp. 173—179.
Gianazza E., Righetti P. G. (1978). Biochim. Biophys. Acta, **540**, 357—364.
Gianazza E., Righetti P. G. (1979a). In: Electrokinetic Separation Methods; Righetti P. G., Van Oss J. C., Vanderhoff J. W., eds. (Elsevier, Amsterdam), pp. 293—311.
Gianazza E., Righetti P. G. (1979b). Prot. Biol. Fluids, **27**, 715—718.
Gianazza E., Astorri C., Righetti P. G. (1979a). J. Chromatogr., **171**, 161—169.
Gianazza E., Chillemi F., Gelfi C., Righetti P. G. (1979b). J. Biochem. Biophys. Methods, **1**, 237—251.
Gianazza E., Righetti P. G. (1980). In: Electrophoresis'79; Radola B. J., ed. (de Gruyter, Berlin), pp. 129—140.
Gianazza E., Gelfi C., Righetti P. G. (1980a). J. Biochem. Biophys. Methods, **3**, 65—75.
Gianazza E., Chillemi F., Righetti P. G. (1980b). J. Biochem. Biophys. Methods, **3**, 135—141.
Gianni A. M., Giglioni B., Comi P., Ottolenghi S., Ferrari M., Furbetta M., Angius M., Cao A. (1981). Hemoglobin, **5**, 349—355.
Giddings J. C., Kucera E., Russell C. P., Myers M. N. (1968). J. Phys. Chem., **72**, 4397—4408.
Giddings J. C. (1969). Separ. Sci., **4**, 181—188.
Giddings J. C., Dahlgren H. (1971). Separ. Sci., **6**, 345—356.
Gidez L. I., Swaney J. B., Murnane S. (1977). J. Lipid Res., **18**, 59—68.

Gierthy J. F., Ellem K. A. O., Kongsvik J. R. (1979). Anal. Biochem., **98**, 27—35.
Giometti C. S., Anderson N. G. (1980). In: Electrophoresis'79; Radola B. J., ed. (de Gruyter, Berlin), pp. 395—404.
Giometti C. S., Anderson N. G., Tollaksen S. L., Edwards J. J., Anderson N. L. (1980). Anal. Biochem., **102**, 47—58.
Godolphin W. J., Stinson R. A. (1974). Clin. Chim. Acta, **56**, 97—103.
Godson G. N. (1970). Anal. Biochem., **35**, 66—76.
Goerth K., Radola B. J. (1980). In: Electrophoresis'79; Radola B. J., ed. (de Gruyter, Berlin), pp. 555—563.
Gonenne A., Ernst R. (1978). Anal. Biochem., **87**, 28—38.
Goode R. L., Balwin J. N. (1973). Prep. Biochem., **3**, 349—361.
Goodman D., Matzura H. (1971). Anal. Biochem., **42**, 481—489.
Gordon A. H. (1975). Electrophoresis of Proteins in Polyacrylamide and Starch Gels (Elsevier, Amsterdam), pp. 14—15.
Görg A., Postel W., Westermeier R. (1977). Z. Lebensm. Unter. Forsch., **164**, 160—162.
Görg A., Postel W., Westermeier R. (1978). Anal. Biochem., **89**, 60—70.
Görg A., Postel W., Westermeier R. (1979a). Z. Lebensm. Unter. Forsch., **168**, 25—28.
Görg A., Postel W., Westermeier R. (1979b). GIT Lab. Med., **2**, 32—40.
Görg A., Postel W., Westermeier R. (1980a). In: Electrophoresis'79; Radola B. J., ed. (de Gruyter, Berlin), pp. 67—78.
Görg A., Postel W., Westermeier R., Gianazza E., Righetti P. G. (1980b). J. Biochem. Biophys. Methods, **3**, 273—284.
Görg A., Postel W., Westermeier R., Gianazza E., Righetti P. G. (1981). In: Electrophoresis'81; Allen R. C., Arnaud P., eds. (de Gruyter, Berlin), pp. 257—270.
Gorovsky M. A., Carlson K., Rosenbaum T. L. (1970). Anal. Biochem., **35**, 359—370.
Graesslin D., Weise H. C. (1974). In: Electrophoresis and Isoelectric Focusing in Polyacrylamide Gel; Allen R. C., Maurer H. R., eds. (de Gruyter, Berlin), pp. 199—205.
Grant G. M., Leaback D. H. (1970). ISCO Applications Research Bulletin No. 3.
Grassmann W. (1950). Z. Angew. Chem., **62**, 1170—1176.
Green M. R., Pastewka J. V., Peacock A. C. (1973). Anal. Biochem., **56**, 43—50.
Groome N. P., Belyavin G. (1975). Anal. Biochem., **63**, 249—254.
Gropp C., Havemann K., Lehmann F. C. (1978). Cancer Res., **42**, 2802—2808.
Grossbach U. (1972). Biochem. Biophys. Res. Commun., **49**, 667—672.
Grubb A. (1973). Anal. Biochem., **55**, 582—592.
Grubhofer N., Borja C. (1977). In: Electrofocusing and Isotachophoresis; Radola B. J., Graesslin D., eds. (de Gruyter, Berlin), pp. 111—120.
Guerrasio A., Saglio G., Mazza U., Pich P., Camaschella C., Ricco G., Gianazza E., Righetti P. G. (1979). Clin. Chim. Acta, **99**, 7—11.
Hackenberg H., Klingenberg M. (1980). Biochemistry, **19**, 548—555.
Haff L. A., Lasky M., Manrique A. (1979). J. Biochem. Biophys. Methods, **1**, 275—286.
Haglund H., Tiselius A. (1950). Acta Chem. Scand., **4**, 957—965.
Haglund H. (1971). In: Methods of Biochemical Analysis; Glick D., ed. (Wiley, Interscience, New York), Vol. 19, pp. 1—104.
Haglund H. (1975). In: Isoelectric Focusing; Arbuthnott J. P., Beeley J. A., eds. (Butterworths, London), pp. 3—22.
Haller W. (1965). Nature, **206**, 693—696.

Halliday J. M., McKeering L. V., Powell L. W. (1976). Cancer Res., **36**, 4486—4490.
Hames B. D. (1981). In: Gel Electrophoresis of Proteins; Hames B. D., Rickwood D., eds. (IRL Press Ltd., London), pp. 50—55.
Hammerstedt R. H., Keith A. K., Boltz, Jr., R. C., Todd P. W. (1979). Arch. Biochem. Biophys., **194**, 565—580.
Handschin U. E., Ritschard N. J. (1976). Anal. Biochem., **71**, 143—148.
Hannig K. (1961). Z. Anal. Chem., **181**, 244—254.
Hannig K. (1969). In: Modern Separation Methods of Macromolecules and Particles; Gerritsen T., ed. (Wiley, Interscience, New York), pp. 45—69.
Hannig K. (1972). In: Techniques of Biochemical Biophysical Morphology; Glick D., Rosenbaum R., eds. (Wiley, New York), Vol. 1, pp. 191—232.
Hannig K. (1978). In: Electrophoresis '78; Catsimpoolas N., ed. (Elsevier, Amsterdam), pp. 69—76.
Hansen J. N. (1976). Anal. Biochem., **76**, 37—44.
Hansen J. N., Pheiffer B. H., Boehnert J. A. (1980). Anal. Biochem., **105**, 192—201.
Harada S. (1975). Clin. Chim. Acta, **85**, 275—283.
Harada S., Agarwal D. P., Goedde H. W. (1978a). Hum. Genet., **44**, 181—185.
Harada S., Agarwal D. P., Goedde H. W. (1978b). Hum. Genet., **40**, 215—220.
Harada S., Agarwal D. P., Goedde H. W. (1980). In: Electrophoresis '79; Radola B. J., ed. (de Gruyter, Berlin), pp. 687—693.
Harell D., Morrison M. (1979). Arch. Biochem. Biophys., **193**, 158—168.
Harpel B. M., Kueppers F. (1980). Anal. Biochem., **104**, 173—174.
Harris H., Hopkinson D. A., Robson E. B. (1974). Hum. Genet., **37**, 237—253.
Harris H., Hopkinson D. A. (1976). Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics, North-Holland, Amsterdam.
Harrison P. M., Hoare R. J., Hay T. J., McCara I. G. (1974). In: Iron in Biochemistry and Medicine; Jacobs A., Worwood M., eds. (Academic Press, London), pp. 73—85.
Hayase K., Kritchevsky D. (1973). Clin. Chim. Acta, **46**, 455—464.
Hayase K., Reisher R., Miller B. F. (1973). Prep. Biochem., **3**, 221—241.
Hayes M. B., Wellner D. (1969). J. Biol. Chem., **244**, 6636—6644.
Hearn M. T. W., Lyttle D. J. (1981). J. Chromatogr., **218**, 483—495.
Hebert J. P., Strobbel B. (1974). LKB Application Note No. 151.
Heideman M. L. (1965). Ann. N. Y. Acad. Sci., **121**, 501—524.
Held W. A., Nomura M. (1973). Biochemistry, **12**, 3273—3281.
Helenius A., Simons K. (1975). Biochim. Biophys. Acta, **415**, 29—79.
Hendeskog G. (1975). J. Chromatogr., **107**, 91—98.
Hill M. J., James A. M., Maxted W. R. (1963). Biochim. Biophys. Acta, **75**, 402—410.
Hirsch E. M., Gray I. (1976). J. Cell Biol., **70**, 358—365.
Hjelmeland L. M., Nebert D. W., Chrambach A. (1978). In: Electrophoresis '78; Catsimpoolas N., ed. (Elsevier, Amsterdam), pp. 29—56.
Hjelmeland L. M., Nebert D. W., Chrambach A. (1979). Anal. Biochem., **95**, 201—208.
Hjelmeland L. M., Chrambach A. (1981). Electrophoresis, **2**, 1—11.
Hjelmeland L. M., Allenmark S., An Der Laan B., Jackiw B. A., Nguyen N. Y., Chrambach A. (1981). Electrophoresis, **2**, 82—90.
Hjertén S. (1961). Biochim. Biophys. Acta, **53**, 514—520.
Hjertén S. (1962a). Arch. Biochem. Biophys. Suppl., **1**, 147—151.
Hjertén S. (1962b). Biochim. Biophys. Acta **62**, 445—449.
Hjertén S. (1967). J. Chromatogr., **9**, 122—219.
Hjertén S., Jersted S., Tiselius A. (1969). Anal. Biochem., **27**, 108—115.
Hjertén S. (1974). J. Chromatogr., **101**, 281—288.
Hjertén S. (1976). In: Methods of Protein Separation; Catsimpoolas N., ed. (Plenum, New York), Vol. 2, pp. 219—231.

Hoare R. J., Harrison P. M., Hoy T. G. (1975). Nature, **255**, 653—654.
Hobart M. J. (1975). In: Isoelectric Focusing; Arbuthnott J. P., Beeley J. A., eds. (Butterworths, London), pp. 275—280.
Hocevar B. J., Northcote D. H. (1957). Nature, **179**, 488—490.
Hoch H., Barr C. H. (1955). Science, **122**, 243—244.
Hohn T., Pollmann W. (1963). Z. Naturforsch., **18B**, 919—925.
Holbrook I. B., Leaver A. G. (1976). Anal. Biochem., **75**, 634—636.
Holmes R. (1967). Biochim. Biophys. Acta, **133**, 174—177.
Holmquist L., Broström H. (1979). J. Biochem. Biophys. Methods, **1**, 117—127.
Holtlund J., Kristensen T. (1978). Anal. Biochem., **87**, 425—432.
Horejsi V. (1979). J. Chromatogr., **178**, 1—13.
Hovanessian A., Awdeh Z. L. (1975). In: Progress in Isoelectric Focusing and Isotachophoresis; Righetti P. G., ed. (Elsevier, Amsterdam), pp. 205—211.
Humphryes K. C. (1970). J. Chromatogr., **49**, 503—510.
Hurley P. M., Catsimpoolas N., Wogan G. N. (1978). In: Electrophoresis '78; Catsimpoolas N., ed. (Elsevier, Amsterdam), pp. 283—296.
Ikeda K., Suzuki S. (1912). U. S. Patent 1015891.
Imada M. (1978). Anal. Biochem., **89**, 292—296.
Inouye M. (1971). J. Biol. Chem., **246**, 4834—4838.
Ishitani K., Listowsky I., Hazard J., Drysdale J. W. (1975). J. Biol. Chem., **250**, 5446—5449.
Just W. W., Werner G. (1977a). In: Cell Separation Methods; Bloemendal H.
Jacobs S. (1971). Prot. Biol. Fluids, **19**, 499—502.
Jacobs S. (1973). Analyst, **98**, 25—33.
Janik B., Dane R. G. (1981). In: Electrophoresis '81; Allen R. C., Arnaud P., eds. (de Gruyter, Berlin), pp. 77—82.
Janson J. C. (1972). Ph. D. Thesis, University of Uppsala, Sweden.
Jensen M., Oski F. A., Nathan D. G., Bunn H. F. (1975). J. Clin. Invest., **55**, 469—476.
Jeppsson J. O., Berglund S. (1972). Clin. Chim. Acta, **40**, 153—158.
Jeppsson J. O., Franzen B., Nilsson V. O. (1978). Sci. Tools, **25**, 69—73.
Johansson B. G., Hjertén S. (1974). Anal. Biochem., **59**, 200—213.
Johnson E. A., Mulloy B. (1976). Carbohydr. Res., **51**, 119—127.
Johnson L. K., Liebke M. M., O'Brien T. S. (1976). Anal. Biochem., **76**, 311—320.
Johnson M. (1978). Ann. Clin. Lab. Sci., **8**, 195—200.
Jonsson M., Pettersson E. (1968). Sci. Tools, **15**, 2—5.
Jonsson M., Pettersson E., Rilbe H. (1969). Acta Chem. Scand., **23**, 1553—1559.
Jonsson M., Pettersson S., Rilbe H. (1973). Anal. Biochem., **51**, 557—576.
Jonsson M., Fredriksson S., Jontell M., Linde A. (1978). J. Chromatogr., **157**, 235—242.
Johnsson M., Rilbe H. (1980). Electrophoresis, **1**, 3—14.
Jonsson M., Stahlberg J., Fredriksson S. (1980). Electrophoresis, **1**, 113—118.
Jonsson M., Fredriksson S. (1981). Electrophoresis, 2, 193—203.
Josephson R. V., Maheswaran S. K., Morr C. V., Jenness R., Lindorfer R. K. (1971). Anal. Biochem., **40**, 476—482.
Jovin T. M., Chrambach A., Naughton M. A. (1964). Anal. Biochem., **9**, 351—362.
Just W. W. (1980). Anal. Biochem., **102**, 134—144.
Just W. W., Leon-V J. O., Werner G. (1975a). In: Progress in Isoelectric Focusing and Isotachophoresis; Righetti P. G., ed. (North-Holland, Amsterdam), pp. 265—280.
Just W. W., Leon-V J. O., Werner G. (1975b). Anal. Biochem., **67**, 590—601.

Just W. W., Werner G. (1977a). In: Cell Separation Methods, Blocmendal H., ed. (North-Holland, Amsterdam), pp. 131—142.
Just W. W., Werner G. (1977b). In: Electrofocusing and Isotachophoresis; Radola B. J., Graesslin D., eds. (de Gruyter, Berlin), pp. 481—493.
Just W. W., Werner G. (1979). In: Electrokinetic Separation Methods; Righetti P. G., Van Oss C. J., Vanderhoff J. W., eds. (Elsevier, Amsterdam), pp. 143—167.
Kaiser K. P., Bruhn L. C., Belitz H. D. (1974). Z. Lebensm. Unters. Forsch., **154**, 339—347.
Kalous V., Vacik J. (1959). Chem. Listy, **53**, 35—37.
Kaltschimdt E., Wittmann H. G. (1970a). Anal. Biochem., **36**, 401—412.
Kaltschimdt E., Wittmann H. G. (1970b). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **67**, 1276—1282.
Kaplan L. J., Foster J. F. (1971). Biochemistry, **10**, 630—636.
Kaplan N. O. (1968). Ann. N. Y. Acad. Sci., **151**, 382—399.
Karlsson C., Davies H., Ohman J., Andersson U. B. (1973). LKB Application Note No. 75.
Keck K., Grossberg A. L., Pressman D. (1973a). Eur. J. Immunol., **3**, 99—102.
Keck K., Grossberg A. L., Pressman D. (1973b). Immunochemistry, **10**, 331—335.
Kenrick K. G., Margolis J. (1970). Anal. Biochem., **33**, 204—207.
Kilmartin J. V., Fogg J., Luzzana M., Rossi Bernardi L. (1973). J. Biol. Chem., **248**, 7039—7043.
Kim W. J., White T. T. (1971). Biochim. Biophys. Acta, **242**, 441—445.
Kint J. A. (1975). Anal. Biochem., **67**, 679—683.
Kinzkofer A., Radola B. J. (1981). Electrophoresis, **2**, 174—183.
Kiryukhin I. F. (1972). Biul. Eksp. Biol. Med., **74**, 120—122.
Klose J., Nowak J., Kade W. (1980). In: Electrophoresis'79; Radola B. J., ed. (de Gruyter, Berlin), pp. 297—312.
Knüfermann. (1977). In: Electrofocusing and Isotachophoresis; Radola B. J., Graesslin D., eds. (de Gruyter, Berlin), pp. 395—404.
Koch H. J. A., Backx J. (1969). Sci. Tools, **16**, 44—47.
Kohn J. (1957). Nature, **180**, 986—988.
Kohnert K. D., Schmid E., Zuhlke H., Fiedler H. (1973). J. Chromatogr., **76**, 263—267.
Kolin A. (1954). J. Chem. Phys., **22**, 1628—1629.
Kolin A. (1955a). J. Chem. Phys., **23**, 407—410.
Kolin A. (1955b). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **41**, 101—110.
Kolin A. (1958). In: Methods of Biochemical Analysis; Glick D., ed. (Wiley, Interscience, New York), Vol. 6, pp. 259—288.
Kolin A. (1970). In: Methods in Medical Research; Olson R. E., ed. (Year Book Med. Publ. Inc., Chicago), Vol. 12, pp. 326—358.
Kolin A. (1976). In: Isoelectric Focusing; Catsimpoolas N., ed. (Academic Press, New York), pp. 1—11.
Kolin A. (1977). In: Electrofocusing and Isotachophoresis; Radola B. J., Graesslin D., eds. (de Gruyter, Berlin), pp. 3—33.
Kömpf J., Bissbort S., Gussmann S., Ritter H. (1975). Humangenetik, **27**, 141—143.
Kopwillen A., Chillemi F., Righetti A. B. B., Righetti P. G. (1973). Prot. Biol. Fluids, **21**, 657—665.
Korant B. D., Lonberg-Holm K. (1974). Anal. Biochem., **59**, 75—82.
Kostner G., Albert W., Holasck A. (1969). Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **350**, 1347—1352.
Krishnamoorthy R., Bianchi Bosisio A., Labie D., Righetti P. G. (1978). FEBS Lett., **94**, 319—323.
Kronberg H., Zimmer H. G., Neuhoff V. (1980). Electrophoresis, **1**, 27—32.

Kronberg H., Zimmer H. G., Neuhoff V. (1981). In: Electrophoresis'81; Allen R. C., Arnaud P., eds. (de Gruyter, Berlin), pp. 413—423.
Kronenberg L. H. (1979). Anal. Biochem., **93**, 189—195.
Kühnl P. (1979). Ärztl. Lab., **25**, 34—43.
Kühnl P. (1981). In: Electrophoresis'81; Allen R. C., Arnaud P., eds. (de Gruyter, Berlin), pp. 563—571.
Kühnl P., Langanke U., Spielmann W., Neubauer M. (1977). Hum. Genet., **40**, 79—86.
Kühnl P., Schmidtmann U., Spielmann W. (1977a). Hum. Genet., **35**, 219—223.
Kühnl P., Schwabenland R., Spielmann W. (1977b). Hum Genet., **38**, 99—106.
Kühnl P., Spielmann W., Loa M. (1978). Vox Sang., **35**, 401—404.
Kühnl P., Spielmann W., Weber W. (1979). Hum. Genet., **46**, 83—87.
Kumarasamy R., Symons R. M. (1979). Anal. Biochem., **95**, 359—364.
Kunkel H., Ceppellini R., Müller-Eberhard U., Wolf J. (1957). J. Clin. Invest., **36**, 1615—1620.
Kunkel H. G., Slater R. J. (1952). Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **80**, 42—51.
Kurian P., Gersten D. M., Suhocki P. V., Ledley G. (1981). Electrophoresis, **2**, 184—186.
Lååas T. (1972). J. Chromatogr., **66**, 347—355.
Lååas T., Olsson I. (1981). Anal. Biochem., **114**, 167—172.
Lambin P., Fine J. M. (1979). Anal. Biochem., **98**, 160—168.
Langton R. W., Cole-IX J. C., Quinn P. F. (1975). Arch. Oral. Biol., **20**, **103—106**.
Laskey R. A., Mills A. D. (1975). Eur. J. Biochem., **56**, 335—340.
Laskey R. A., Mills A. D. (1977). FEBS Lett., **82**, 314—317.
Laskey R. A. (1980). In: Methods in Enzymology; Grossman L., Moldave K., eds. (Academic Press, New York), Vol. 65, pp. 363—370.
Lasky M.. Manrique A. (1980). Electrophoresis, **1**, 112—119.
Latner A. L. (1973). Ann. N. Y. Acad. Sci., **209**, 281—298.
Latner A. L. (1975). Advan. Clin. Chem., **17**, 193—215.
Latner A. L., Emes V. (1975). In: Progress in Isoelectric Focusing and Isotachophoresis; Righetti P. G., ed. (Elsevier, Amsterdam), pp. 223—233.
Latner A. L., Parsons M. E., Skillen A. W. (1970). Biochem. J., **118**, 299—302.
Laurell C. B. (1966). Anal. Biochem., **15**, 45—52.
Laurent T. C., Killander J. (1964). J. Chromatogr., **14**, 317—325.
Leaback D. H., Robinson H. K. (1974). FEBS Lett., **40**, 192, 195.
Leaback D. M., Robinson H. K. (1975). Biochem. Biophys. Res. Commun., **67**, 248—254.
Leaback D. H., Rutter A. C. (1968). Biochem. Biophys. Res. Commun., **32**, 447—453.
Leaback D. H., Wrigley C. W. (1976). In: Chromatographic and Electrophoretic Techniques; Smith I., ed., 4th edition (Heinemann Med. Books, London), Vol. II, pp. 272—320.
Leader D. P. (1980). J. Biochem. Biophys. Methods., **3**, 247—248.
Legocki R. P., Verma D. P. S. (1981). Anal. Biochem., **111**, 385—392.
Leise E. M., Le Sane T. (1974). Prep. Biochem., **4**, 395—410.
Lemkin P. F., Lipkin L. E. (1981). In: Electrophoresis'81; Allen R. C., Arnaud P., eds. (de Gruyter, Berlin), pp. 401—411.
Lewis G. N., Randall M. (1921). J. Amer. Chem. Soc., **43**, 1112—1116.
Li Y. T., Li S. C. (1973). Ann. N. Y. Acad. Sci., **209**, 187—197.
Lim R., Huang J. J., Davis G. A. (1969). Anal. Biochem., **29**, 48—57.
Loening U. E. (1967). Biochem. J., **102**, 251—257.
Lostanlen D., Gacon G., Kaplan J. C. (1980). Eur. J. Biochem., **112**, 179—183.
Ludwig C. S. (1856). Sitzber. Akad. Wiss. Wien., **20**, 539—556.
Lundahl P., Hjertén S. (1973). Ann. N. Y. Acad. Sci., **209**, 94—111.

Lundin H., Hjalmarsson S. G., Davies H. (1975). LKB Application Note No. 194.
Luner S. J., Kolin A. (1970). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **66**, 898—903.
Luner S. J., Kolin A. (1972). U. S. Patent 3664939.
Lutin W. A., Kyle C. E., Freeman J. A. (1977). In: Electrofocusing and Isotachophoresis; Radola B. J., Graesslin D., eds. (de Gruyter, Berlin), pp. 93—106.
MacInnes D. A. (1939). The Principles of Electrochemistry, Reinhold, New York.
Macko V., Stegemann H. (1969). Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **350**, 917—919.
Macko V., Stegemann H. (1970). Anal. Biochem., **37**, 186—190.
Magnusson R. P., Jackiw A. (1979). J. Biochem. Biophys. Methods, **1**, 65—68.
Maher J. R., Trendle W. O., Schultz R. L. (1956). Naturwissenschaften, **43**, 423—427.
Maizel J. V. (1971). In: Methods in Virology; Maramorosch K., Koprowski H., eds. (Academic Press, New York), Vol. 5, pp. 179—191.
Malik N., Berrie A. (1972). Anal. Biochem., **49**, 173—176.
Mandel B. (1971). Virology, **44**, 554—560.
Manske W., Bohn B., Brossmer R. (1977). In: Electrofocusing and Isotachophoresis; Radola B. J., Graesslin D., eds. (de Gruyter, Berlin), pp. 497—502.
Margolis J., Wrigley C. W. (1975). J. Chromatogr., **106**, 204—210.
Marshall R. C., Blagrove R. J. (1979). J. Chromatogr., **172**, 351—356.
Marshall T., Latner A. L. (1981). Electrophoresis, **2**, 228—235.
Martin A. J. P., Hampson F. (1978). J. Chromatogr., **159**, 101—110.
Massey T. H., Deal Jr. W. C. (1973). J. Biol. Chem., **248**, 56—61.
Matsudaira P. T., Burgess D. R. (1978). Anal. Biochem., **87**, 386—396.
Matsumura T., Noda H. (1973). Anal. Biochem., **96**, 39—45.
Mauk M. R., Girotti A. W. (1974). Biochemistry, **13**, 1757—1761.
Maxam A. M., Gilbert W. (1977). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **74**, 560—565.
Mayer J. W. (1976). Anal. Biochem., **76**, 369—373.
McConkey E. H. (1979). Anal. Biochem., **96**, 39—45.
McDonell M. W., Simon M. N., Studier F. W. (1977). J. Mol. Biol., **110**, 119—145.
McDuffie N. M., Dietrich C. P., Nader H. B. (1975). Biopolymers, **14**, 1473—1486.
McGillivray A. J., Rickwood D. (1974). Eur. J. Biochem., **41**, 181—190.
McGuire J. K., Miller T. Y., Tipps R. W., Snyder R. S., Righetti P. G. (1980). J. Chromatogr., **194**, 323—333.
Mel H. C. (1960). Science, **132**, 1255—1256.
Mel H. C. (1964). J. Theor. Biol., **6**, 307—324.
Melino G., Stefanini S., Chiancone E., Antonini E. (1978). FEBS Lett., **86**, 136—138.
Merrifield R. B. (1969). Adv. Enzymol., **32**, 221—241.
Merril C. R., Switzer R. C., Van Keuren M. L. (1979). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76**, 4335—4339.
Merril C. R., Goldman D., Sedman S. A., Ebert M. H. (1981). Science, **211**, 1437—1438.
Merril C. R., Goldman D., Van Keuren M. L. (1982). Electrophoresis, **3**, 17—23.
Meselson M., Stahl F. W., Vinogradov J. (1957). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **43**, 581—585.
Miller D. W., Elgin S. R. C. (1974). Anal. Biochem., **60**, 142—148.
Mitchell H. K., Herrenberg L. A. (1957). Anal. Chem., **29**, 1229—1233.
Mitchell W. M. (1967). Biochim. Biophys. Acta, **147**, 171—174.
Molnarova B., Sova O. (1974). Abstr. Commun. 9th Fed. Europ. Biochem. Soc. Budapest, p. 432.
Monte M., Beuzard Y., Rosa J. (1976). Am. J. Pathol., **66**, 753—760.

Moore H. D. M., Hibbit K. G. (1975). J. Reprod. Fert., **44**, 329—332.
Morris C. J. O. R., Morris P. (1976). Separation Methods in Biochemistry, 2nd ed. (Pitman, London), pp. 853—876.
Morris C. J. O. R. (1978). J. Chromatogr., **159**, 33—46.
Murel A., Kirjanen I., Kirret O. (1979). J. Chromatogr., **174**, 1—11.
Nader H. B., McDuffie N. M., Dietrich C. P. (1974). Biochem. Biophys. Res. Commun., **57**, 488—493.
Nagel R. L., Gibson Q. H. (1971). J. Biol. Chem., **246**, 69—75.
Nakhleh E. T., Samra S. A., Awdeh Z. L. (1972). Anal. Biochem., **49**, 218—224.
Narayanan K. R., Ray A. S. (1977). In: Electrofocusing and Isotachoophoresis; Radola B. J., Graesslin D., eds. (de Gruyter, Berlin), pp. 221—231.
Needleman S. B., Koening H., Goldstone A. D. (1975). Biochim. Biophys. Acta, **379**, 57—73.
Neuhoff V. (1973). Micromethods in Molecular Biology (Springer-Verlag, Berlin), pp. 49—56.
Nguyen N. Y., Chrambach A. (1976). Anal. Biochem., **74**, 145—153.
Nguyen N. Y., Chrambach A. (1977a). Anal. Biochem., **79**, 462—469.
Nguyen N. Y., Chrambach A. (1977b). Anal. Biochem., **81**, 54—62.
Nguyen N. Y., Chrambach A. (1977c). Anal. Biochem., **82**, 226—235.
Nguyen N. Y., Salokangas A., Chrambach A. (1977). Anal. Biochem., **78**, 287—294.
Nguyen N. Y., Rodbard D., Svendsen P. J., Chrambach A. (1977a). Anal. Biochem., **77**, 39—55.
Niitsu Y., Listowsky I. (1973). Arch. Biochem. Biophys., **158**, 276—281.
Niitsu Y., Kohgo Y., Yokota M., Urushizaki I. (1975). Ann. N. Y. Acad. Sci., **259**, 450—458.
Nilsson P., Wadström T., Vesterberg O. (1970). Biochim. Biophys. Acta, **221**, 146—148.
Noble R. L., Yamashiro D., Li C. H. (1977). Int. J. Peptide Prot. Res., **10**, 385—393.
Nozaki Y., Tanford C. (1971). J. Biol. Chem., **264**, 2211—2217.
Ockley B. R., Kirsch D. R., Morris N. R. (1980). Anal. Biochem., **105**, 361—363.
O'Brien T. J., Liebke H. H., Cheung H. S., Johnson L. K. (1976). Anal. Biochem., **72**, 38—44.
Ochs D. C., McConkey E. H., Sammons D. W. (1981). Electrophoresis, **2**, 304—307.
O'Connell P. B. H., Brady C. J. (1976). Anal. Biochem., **76**, 63—76.
O'Farrell P. (1975). J. Biol. Chem., **250**, 4007—4021.
Ogita Z. I., Market C. L. (1979). Anal. Biochem., **99**, 233—241.
Ogston A. G. (1958). Trans. Faraday Soc., **54**, 1754—1756.
Olden K., Yamada K. M. (1977). Anal. Biochem., **78**, 483—490.
Olsson I., Lååas T. (1981). J. Chromatogr., **215**, 373—378.
Omoto K., Miyake K. (1978). Jpn. J. Hum. Genet., **23**, 119—125.
Ornstein L. (1964). Ann. N. Y. Acad. Sci., **121**, 321—349.
Osterman L. (1970). Sci. Tools, **17**, 31—33.
Otavsky W. I., Bell T., Saravis C., Drysdale J. W. (1977). Anal. Biochem., **78**, 302—307.
Pagé M., Belles-Isles M. (1978). Can. J. Biochem., **56**, 853—856.
Palusinski O. A., Allgyer T. T., Mosher R. A., Bier M., Saville D. A. (1981). Biophys. Chem., **13**, 193—202.
Panyim S., Chalkley R. (1971). J. Biol. Chem., **346**, 7557—7560.
Papayannopoulou Th., Kurachi S., Brice M., Nakamoto B., Stamatoyannopoulos G. (1981). Blood, **57**, 531—536.
Papeschi G., Bordi S., Beni C., Ventura C. (1976). Biochim. Biophys. Acta, **453**, 192—199.

Park C. M. (1973). Ann. N. Y. Acad. Sci., **209**, 237—256.
Paus P. N. (1971). Anal. Biochem., **42**, 327—376.
Peacock A. C., Dingman C. W. (1967). Biochemistry, **6**, 1818—1824.
Perella M., Heyda A., Mosca A., Rossi-Bernardi L. (1978). Anal. Biochem., **88**, 212—224.
Perella M., Samaja M., Rossi-Bernardi L. (1979). J. Biol. Chem., **254**, 8748—8750.
Perella M., Cremonesi L., Vannini Parenti I., Benazzi L., Rossi-Bernardi L. (1980). Anal. Biochem., **104**, 126—132.
Perella M., Cremonesi L., Benazzi L., Rossi-Bernardi L. (1981). J. Biol. Chem., **256**, 11098—11103.
Perutz M. F. (1970). Nature, **228**, 726—730.
Perutz M. F., Kilmartin J. V., Nishikura K., Fogg J. H., Butler P. J. G., Rollema H. S. (1980). J. Mol. Biol., **138**, 649—670.
Peterson J. I., Tipton H. W., Chrambach A. (1974). Anal. Biochem., **62**, 274—280.
Peterson R. F. (1971). J. Agr. Food Chem., **19**, 595—599.
Petrilli P., Sannia G., Marino G. (1977). J. Chromatogr., **135**, 511—513.
Petterson E. (1969). Acta Chem. Scand., **23**, 2631—2635.
Philpot J. St. L. (1940). Trans. Varaday Soc., **36**, 38—46.
Pittz E. P., Jones R., Goldberg L., Coulston F. (1977). Biorheology, **14**, 33—42.
Poduslo J. F., Rodbard D. (1980). Anal. Biochem., **101**, 394—406.
Poehling H. M., Neuhoff V. (1980). Electrophoresis, **1**, 198—200.
Poehling H. M., Neuhoff V. (1981). Electrophoresis, **2**, 141—147.
Pogacar P., Jarecki R. (1974). In: Electrophoresis and Isoelectric Focusing in Polyacrylamide Gel; Allen R. C., Maurer H., eds. (de Gruyter, Berlin), pp. 153—158.
Pollack S. (1979). Biochem. Biophys. Res. Commun., **87**, 1252—1255.
Porath J. (1963). J. Applied Chem., **6**, 233—236.
Porath J., Jansson J. C., Låås T. (1971). J. Chromatogr., **60**, 167—173.
Powell L., Alpert E., Isselbacher K. J., Drysdale J. W. (1975). Br. J. Haematol., **30**, 47—61.
Poyart C. F., Guesnon P., Bohn B. M. (1981). Biochem. J., **195**, 493—501.
Presta M., Giglioni B., Ottolenghi S., Gianni A. M., Capaldi A., Trento M., Saglio G. (1982). Am. J. Hematol., in press.
Pruzik Z. (1974). J. Chromatogr., **91**, 867—872.
Pulleyblank D. E., Booth G. M. (1981). J. Biochem. Biophys. Methods, **4**, 339—346.
Quarmby C. (1981). Electrophoresis, **2**, 203—212.
Quast R., Vesterberg O. (1968). Acta Chem. Scand., **22**, 1499—1508.
Quast R. (1979). In: Electrokinetic Separation Methods; Righetti P. G., Van Oss C. J. and Vanderhoff J. W., eds. (Elsevier, Amsterdam), pp. 221—227.
Quast R. (1977). In: Electrofocusing and Isotachophoresis; Radola B. J. and Graesslin D., eds. (de Gruyter, Berlin), pp. 455—462.
Quinn J. R. (1973). J. Chromatogr., **76**, 520—522.
Qureshi R. A., Punnett H. H. (1981). In: Electrophoresis '81; Allen R. C. and Arnaud P., eds. (de Gruyter, Berlin), pp. 83—87.
Radola B. J. (1969). Biochim. Biophys. Acta, **194**, 335—338.
Radola B. J. (1973a). Biochim. Biophys. Acta, **295**, 412—428.
Radola B. J. (1973b). Ann. N. Y. Acad. Sci., **209**, 127—143.
Radola B. J. (1975). In: Isoelectric Focusing; Arbuthnott J. P. and Beeley J. A., eds. (Butterworths, London), pp. 182—197.
Radola B. J. (1975). In: Isoelectric Focusing; Catsimpoolas N., ed. (Academic Press, New York), pp. 119—168.
Radola B. J., Graesslin D., eds. (1977). Electrofocusing and Isotachophoresis, de Gruyter, Berlin.

Radola B. J., Tschesche H., Schuricht H. (1977). In: Electrofocusing and Isotachophoresis; Radola B. J. and Graesslin D., eds. (de Gruyter, Berlin), pp. 97—110.
Radola B. J. (1980a). In: Electrophoresis '79; Radola B. J., ed. (de Gruyter, Berlin), pp. 79—94.
Radola B. J. (1980b). Electrophoresis, **1**, 43—56.
Radola B. J., ed. (1980c). Electrophoresis '79, de Gruyter, Berlin.
Radola B. J., Kinzkofer A., Frey M. (1981). In: Electrophoresis '81; Allen R. C. and Arnaud P., eds. (de Gruyter, Berlin), pp. 181—189.
Ragetli H. W., Weintraub M. (1966). Biochim. Biophys Acta, **112**, 160—167.
Ragland W. L., Pace J. L., Kemper U. L. (1974). Anal. Biochem., **59**, 24—30.
Rahbar S. (1968). Clin. Chim. Acta, **22**, 296—301.
Rapaport R. N., Jackiw A., Brown R. K. (1980). Electrophoresis, **1**, 122—126.
Rathnam P., Saxena B. B. (1970). J. Biol. Chem., **245**, 3725—3731.
Raymond S., Weintraub L. (1959). Science, **130**, 711—713.
Raymond S., Nakamichi M. (1962). Anal. Biochem., **3**, 23—32.
Raymond S., Nakamichi M. (1964). Anal. Biochem., **7**, 225—230.
Reich G., Sieber H. (1966). Z. Chem., **6**, 351—356.
Reisner A. H., Newes P., Bucholtz C. (1975). Anal. Biochem., **64**, 509—516.
Renart J., Reiser J., Stark G. R. (1979). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76**, 3116—3120.
Rice R. H., Horst J. (1972). Virology, **49**, 602—610.
Rickwood D., Hames B. (eds.) (1981). Gel Electrophoresis of Nucleic Acids, IRL Press, Oxford.
Righetti P. G., Drysdale J. W. (1971). Biochim. Biophys. Acta, **236**, 17—28.
Righetti P. G., Little E. D., Wolf G. (1971). J. Biol. Chem., **246**, 5742—5747.
Righetti P. G., Drysdale J. W. (1973). Ann. N. Y. Acad. Sci., **209**, 163—186.
Righetti P. G., Drysdale J. W. (1974). J. Chromatogr., **98**, 271—321.
Righetti P. G., Righetti A. B. B. (1974). Abstr. Commun. 9th Fed. Eur. Biochem. Soc. Budapest, p. 432.
Righetti P. G., Pagani M., Gianazza E. (1975a). J. Chromatogr., **109**, 341—356.
Righetti P. G., Bianchi Bosisio A. R., Galante E. (1975b). Anal. Biochem., **63**, 423—432.
Righetti P. G. (ed.) (1975a). Progress in Isoelectric Focusing and Isotachophoresis (Elsevier, Amsterdam).
Righetti P. G. (1975b). Separ. Purif. Methods, **4**, 23—72.
Righetti P. G., Righetti A. B. B. (1975). In: Isoelectric Focusing Arbuthnott J. P., Becley J. A., eds. (Butterworth, London).
Righetti P. G., Drysdale J. W. (1976). Isoelectric Focusing (North-Holland, Amsterdam).
Righetti P. G., Gianazza E., Bianchi Bosisio A. (1976). Giorn. Ital. Chim. Clin., **1**, 11—46.
Righetti P. G., Caravaggio T. (1976). J. Chromatogr., **127**, 1—28.
Righetti P. G. (1977). J. Chromatogr., **138**, 213—215.
Righetti P. G., Balzarini L., Gianazza E., Brenna O. (1977a). J. Chromatogr., **134**, 279—284.
Righetti P. G., Gianazza E., Brenna O., Galante E. (1977b). J. Chromatogr., **137**, 171—181.
Righetti P. G., Molinari B. M., Molinari G. (1977c). J. Dairy Res., **44**, 69—72.
Righetti P. G., Chillemi F. (1978). J. Chromatogr., **157**, 243—251.
Righetti P. G., Krishnamoorthy R., Gianazza E., Labie D. (1978a). J. Chromatogr., **166**, 455—460.

Righetti P. G., Gacon G., Gianazza E., Lostanlen D., Kaplan J. C. (1978b). Biochem. Biophys. Res. Commun., **85**, 1575—1581.
Righetti P. G., Chrambach A. (1978). Anal. Biochem., **90**, 633—643.
Righetti P. G., Gianazza E. (1978). Biochim. Biophys. Acta, **532**, 137—146.
Righetti P. G., Brown R. P., Stone A. L. (1978c). Biochim. Biophys. Acta, **542**, 232—244.
Righetti P. G. (1979). J. Chromatogr., **173**, 1—5.
Righetti P. G., Gianazza E. (1979). Prot. Biol. Fluids, **27**, 711—714.
Righetti P. G., Krishnamoorthy R., Lapoumerouilie C., Labie D. (1979a). J. Chromatogr., **177**, 219—225.
Righetti P. G., Menozzi M., Gianazza E., Valentini L. (1979b). FEBS Lett., **101**, 51—55.
Righetti P. G., Van Oss C. J., Vanderhoff J. (eds.). (1979c). Electrokinetic Separation methods, Elsevier, Amsterdam.
Righetti P. G. (1979d). In: Electrokinetic Separation Methods; Righetti P. G., Van Oss C. J., Vanderhoff J., eds. (Elsevier, Amsterdam), pp. 389—441.
Righetti P. G., Gianazza E., Bianchi Bosisio A. (1979e). In: Recent Developments in Chromatography and Electrophoresis; Frigerio A., Renoz L., eds. (Elsevier, Amsterdam), Vol. 9, pp. 1—36.
Righetti P. G., Gianazza E., Gianni A. M., Comi P., Giglioni B., Ottolenghi S., Secchi C., Rossi Bernardi L. (1979f). J. Biochem. Biophys. Methods, **1**, 47—57.
Righetti P. G. (1980). J. Chromatogr., **190**, 275—282.
Righetti P. G., Gianazza E. (1980). In: Electrophoresis '79; Radola B. J., ed. (de Gruyter, Berlin), pp. 23—38.
Righetti P. G., Gianazza E., Bianchi Bosisio A. (1980a). In: Recent Developments in Chromatography and Electrophoresis; Frigerio A., McCamish M., eds. (Elsevier, Amsterdam), Vol. 10, pp. 89—117.
Righetti P. G., Gianazza E., Ek K. (1980b). J. Chromatogr., **184**, 415—456.
Righetti P. G., Muneroni P., Todesco R., Carini S. (1980c). Electrophoresis, **1**, 37—42.
Righetti P. G. (1981). In: Electrophoresis '81; Allen R. C., Arnaud P., eds. (de Gruyter, Berlin), pp. 3—16.
Righetti P. G., Bianchi Bosisio A. (1981). Electrophoresis, 2, 65—75.
Righetti P. G., Gianazza E. (1981). In: Electrophoresis'81; Allen R. C., Arnaud P., eds. (de Gruyter, Berlin), pp. 655—665.
Righetti P. G., Hjertén S. (1981). J. Biochem. Biophys. Methods, **5**, 259—272.
Righetti P. G., Tudor G., Ek K. (1981a). J. Chromatogr., **220**, 115—194.
Righetti P. G., Brost B. C. W., Snyder R. S. (1981b). J. Biochem. Biophys. Methods, **4**, 347—363.
Righetti P. G., Gelfi C., Bianchi Bosisio A. (1981c). Electrophoresis, **2**, 291—295.
Righetti P. G., Macelloni C. (1982). J. Biochem. Biophys. Methods, **6**, 1—15.
Rilbe H., Pettersson S. (1968). Separ. Sci., **3**, 209—234.
Rilbe H. (1970). Prot. Biol. Fluids, **17**, 369—382.
Rilbe H. (1971). Acta Chem. Scand., **25**, 2768—2769.
Rilbe H. (1971). Acta Chem. Scand., **25**, 2768—2769.
Rilbe H. (1973a). Ann. N. Y. Acad. Sci., **209**, 11—22.
Rilbe H. (1973b). Ann. N. Y. Acad. Sci., **209**, 80—93.
Rilbe H., Pettersson S. (1975a). In: Isoelectric Focusing; Arbuthnott J. P., Beeley J. A., eds. (Butterworths, London), pp. 44—57.
Rilbe H., Forcheimer A., Pettersson S., Jonsson M. (1975b). In: Progress in Isoelectric Focusing and Isotachophoresis; Righetti P. G., ed. (Elsevier, Amsterdam), pp. 51—63.
Rilbe H. (1976). In: Isoelectric Focusing; Catsimpoolas N., ed. (Academic Press, New York), pp. 14—52.

Rilbe H. (1977). In: Electrofocusing and Isotachophoresis; Radola B. J., Graesslin D., eds. (de Gruyter, Berlin), pp. 35—50.
Rilbe H. (1978). J. Chromatogr., **159**, 193—205.
Rilbe H. (1981a). Electrophoresis, **2**, 261—267.
Rilbe H. (1981b). Electrophoresis, **2**, 268—272.
Riley R. F., Coleman M. K. (1968a). J. Lab. Clin. Med., **72**, 714—720.
Rodbard D., Chrambach A. (1970). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **65**, 970—977.
Rodbard D., Chrambach A. (1971). Anal. Biochem., **40**, 95—134.
Rodbard D., Levitov C., Chrambach A. (1972). Separ. Sci., **7**, 705—723.
Rodbard D., Chrambach A., Weiss G. H. (1974). In: Electrophoresis and Isoelectrofocusing in Polyacrylamide Gel; Allen R. C. and Maurer H. R., eds. (de Gruyter, Berlin), pp. 62—105.
Rodbard D. (1976). In: Methods of Protein Separation; Catsimpoolas N., ed. (Plenum Press, New York), Vol. 2, pp. 145—179.
Rose C., Harboe N. M. G. (1970). Prot. Biol. Fluids, **17**, 397—400.
Rosén A., Ek K., Aman P. (1979a). J. Immunol. Methods, **28**, 1—11.
Rosén A., Ek K., Aman P., Vesterberg O. (1979b). Prot. Biol. Fluids, **27**, 707—710.
Rosén A. (1980). In: Electrophoresis '79; Radola B. J. ed. (de Gruyter, Berlin), pp. 105—116.
Rosengren A., Bjellqvist B., Gasparic V. (1977). In: Electrofocusing and Isotachophoresis; Radola B. J., Graesslin D., eds. (de Gruyter, Berlin), pp. 165—171.
Rosengren A., Bjellqvist B., Gasparic V. (1978). U. S. patent No. 4130470, December 19, 1978.
Rosengren A., Bjellqvist B., Gasparic V. (1981). German patent No. 2656162, March 9, 1981.
Rüchel R., Mesecke S., Wolfrum D. I., Neuhoff V. (1973). Hoppe Seyler's Z., Physiol. Chem., **354**, 1351—1368.
Rüchel R., Brager M. D. (1975). Anal. Biochem., **68**, 415—428.
Rüchel R. (1977). J. Chromatogr., **132**, 451—468.
Rüchel R., Steere R. L., Erbe E. F. (1978). J. Chromatogr., **166**, 563—575.
Rücher W., Radola B. J. (1971). Planta, **99**, 192—198.
Saglio G., Ricco G., Mazza U., Camaschella C., Pich P. G., Gianni A. M., Gianazza E., Righetti P. G., Giglioni B., Comi P., Gusmeroli M., Ottolenghi S. (1979). Proc. Natl. Sci. USA, **76**, 3420—3424.
Salaman M. R., Williamson A. R. (1971). Biochem. J., **122**, 93—99.
Sammons D. W., Adams L. D., Nishizawa E. E. (1981). Electrophoresis, **2**, 135—141.
Samols E., Williams H. S. (1961). Nature, **190**, 1211—1212.
Sanders M. M., Groppi Jr., V. E., Browning E. T. (1980). Anal. Biochem., **103**, 157—165.
Saravis C. A., Zamchek N. (1979). J. Immunol. Methods, **29**, 91—96.
Saravis C. A., O'Brien M., Zamcheck N. (1979). J. Immunol. Methods, **29**, 97—100.
Saravis C. A., Cunningham C. G., Marasco P. V., Cook R. B., Zamcheck N. (1980a). In: Electrophoresis '79; Radola B. J. ed. (de Gruyter, Berlin), pp. 117—122.
Saravis C. A., Cantaroa W., Marasco P. V., Burke B., Zamcheck N. (1980b), Electrophoresis, **1**, 191—193.
Satterlee L. D., Snyder H. E. (1969). J. Chromatogr., **41**, 417—422.
Savitskii A. P., Ugarova N. N., Berezin I. V. (1978). Dokl. Akad. Nauk SSSR, **241**, 977—980.
Schaffer H. E., Johnson F. M. (1973). Anal. Biochem., **51**, 577—583.
Schapira F., Gregori C., Banrogues I., Vidailhet M., Despoisses S., Vignerou C. (1979). Hum. Genet., **46**, 89—96.

Schmelzer W., Behne D. (1975). In: Progress in Isoelectric Focusing and Isotachophoresis; Righetti P. G., ed. (Elsevier, Amsterdam), pp. 257—264.
Schmidt-Ullrich R., Wallach D. F. H. (1977). In: Biological and Biomedical Applications of Isoelectric Focusing: Catsimpoolas N., Drysdale J. W., eds. (Plenum Press, New York), pp. 191—210.
Schoos R., Schoos-Barbette S., Lambotte C. (1978). Clin. Chim. Acta, **86**, 61—70.
Schwartz G. P., Burke G. T., Katsoyannis P. G. (1981). Int. J. Peptide Prot. Res., **17**, 243—255.
Seaman G. V. F. (1975). In: The Red Blood Cell; Surgenor D. M. N., ed. (Academic Press, New York), Vol. II, pp. 1135—1129.
Secchi C. (1973). Anal. Biochem., **51**, 448—455.
Seiler N., Thobe J., Werner G. (1970a). Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **351**, 865—868.
Seiler N., Thobe J., Werner G. (1970b). Z. Anal. Chem., **252**, 179—182.
Serwer P. (1980). Biochemistry, **19**, 3001—3005.
Shaaya E. (1976). Anal. Biochem., **75**, 325—328.
Shafritz D. A., Drysdale J. W. (1975). Biochemistry, **14**, 61—68.
Sharp P. A., Sugden B., Sanbrook J. (1973). Biochemistry, **12**, 3055—3060.
Shaw C. R., Prasad R. (1970). Biochem. Genet., **4**, 297—301.
Sherbet G. V., Lakshmi M. S., Rao K. V. (1972). Exp. Cell. Res., **70**, 113—123.
Sherbet G. V., Lakshmi M. S. (1973). Biochim. Biophys. Acta, **298**, 50—58.
Sherbet G. V. (1978). The Biophysical Characterization of the Cell Surface (Academic Press, London).
Sherbet G. V., Lakshmi M. S. (1974). Oncology, **29**, 335—345.
Sherbet G. V., Lakshmi M. S. (1975). In: Isoelectric Focusing; Arbuthnott J. P. and Beeley J. A., eds., (Butterworths, London), pp. 338—346.
Sherbet G. V., Lakshmi M. S. (1976). In: Molecular Base of Malignancy; Deutsch E., Moser H., Rainer H. and Stacher A., eds. (Thieme, Stuttgart), pp. 5—20.
Siciliano M. J., Shaw C. R. (1976). In: Chromatographic and Electrophoretic Techniques; Smith I., ed. (Heinemann W. Med. Books Ltd., London), Vol. 2, pp. 185—205.
Siemankowski R. F., Giambalvo A., Dreizen P. (1978). Physiol. Chem. Physics, **10**, 415—434.
Simplicio J., Schwanzer K., Maenpa F. (1975). J. Amer. Chem. Soc., **97**, 7319—7323.
Singh S., Klose J., Willers I., Goedde M. W. (1978). In: Electrophoresis '78; Catsimpoolas N., ed. (North-Holland, Amsterdam), pp. 297—304.
Singh S., Willers I., Goedde H. W., Klose J. (1981). In: Electrophoresis '81; Allen R. C. and Arnaud P., eds. (de Gruyter, Berlin), pp. 289—294.
Sluyterman L. A. Æ., Wijdenes J. (1977). In: Electrofocusing and Isotachophoresis; Radola B. J. and Graesslin D., eds. (de Gruyter, Berlin), pp. 463—466.
Sluyterman L. A. Æ., Elgerson O. (1978). J. Chromatogr., **150**, 17—30.
Sluyterman L. A. Æ., Wijdenes J. (1978). J. Chromatogr., **150**, 31—44.
Sluyterman L. A. Æ., Wijdenes J. (1981a). J. Chromatogr., **206**, 429—440.
Sluyterman L. A. Æ., Wijdenes J. (1981b). J. Chromatogr., **206**, 441—447.
Smith I., Lightstone P. J., Perry J. D. (1971). Clin. Chim. Acta, **35**, 59—66.
Smithies O., Poulik M. D. (1956). Nature, **117**, 1033—1034.
Smyth C. J., Arbuthnott J. P. (1974). Med. Microbiol., **4**, 41—66.
Smyth C. J., Söderholm J., Wadström T. (1977). LKB, Application Note No. 269, March 1977.
Soave C., Pioli F., Viotti A., Salamini R., Righetti P. G. (1975). Maydica, **20**, 83—94.
Söderberg L., Buckley D., Hagström G., Bergström J. (1980). Prot. Biol. Fluids, **27**, 687—691.

Söderholm J., Allestam P., Wadström T. (1972). FEBS Lett., **24**, 89—92.
Söderholm J., Lidström P. A. (1975). In: Isoelectric Focusing; Arbuthnott J. P. and Beeley J. A., eds. (Butterworts, London), pp. 143—146.
Söderholm J., Smyth C. J. (1975). In: Progress in Isoelectric Focusing and Isotachophoresis; Righetti P. G., ed. (Elsevier, Amsterdam), pp. 99—114.
Söderholm J., Smyth C. J., Wadström T. (1975). Scand. J. Immunol., **4**, Suppl. **2**, 107—113.
Sorensen S. P. L., Linderstrom Lang K., Lund E. (1926). C. R. Trav. Lab. Carlsberg, **16**, 5—15.
Soret C. (1879). Arch. Sci. Phys. Nath. (Genève), **2**, 48—56.
Spencer E. M., King T. P. (1971). J. Biol. Chem., **246**, 201—208.
Sperber E. (1946). J. Biol. Chem., **166**, 75—85.
Spicer K. M., Allen R. C., Buse M. G. (1978). Diabetes, **27**, 384—390.
Spies J. R., Bernton H. S., Stevens M. (1941). J. Am. Chem. Soc., **63**, 2163—2166.
Spragg J., Kaplan A. P., Austen K. F. (1973). Ann. N. Y. Acad. Sci., **209**, 372—386.
Squire P. G. (1964). Arch. Biochem. Biophys., **107**, 471—480.
Stathakos D. (1975). In: Progress in Isoelectric Focusing and Isotachophoresis; Righetti P. G., ed. (Elsevier, Amsterdam), pp. 65—75.
Stathakos D., Vellios A., Koussoulakos S. (1980). In: Electrophoresis '79; Radola B. J., ed. (de Gruyter, Berlin), pp. 517—528.
Steck G., Leuthard P., Bürk R. R. (1980). Anal. Biochem., **107**, 21—24.
Stefanini S., Chiancone E., Vecchini P., Antonini E. (1976). Mol. Cell. Biochem., **13**, 55—61.
Stegemann H., Franksen H., Macko V. (1973). Z. Naturforsch., **28**, 722—732.
Stein S., Böhlen P., Stone J., Daiman W., Udenfriend S. (1973). Arch. Biochem. Biophys., **155**, 203—208.
Steinhardt J., Leidy J. G., Mooney J. P. (1972). Biochemistry, **11**, 1809—1817.
Stenmann U. K., Gräsbeck R. (1971). Biochim. Biophys. Acta, **286**, 243—251.
Stibler H. (1979). J. Neurol. Sci., **42**, 275—281.
Stimpson D. I., Cann J. R. (1977). Biophys. Chem., **7**, 115—119.
Strain H. H. (1939). J. Amer. Chem. Soc., **61**, 1291—1295.
Strongin A. J. A., Baldnev A. P., Levin Z. D. (1973). Sci. Tools, **20**, 34—35.
Suran A. A., Tarver H. (1975). Arch. Biochem. Biophys., **111**, 399—406.
Suzuki T., Benesch R. E., Yung S., Benesch R. (1973). Anal. Biochem., **55**, 249—254.
Svensson H. (1948). In: Advances in Protein Chemistry; Anson M. L. and Edsall J. T., eds. (Academic Press, New York), Vol. IV, pp. 251—295.
Svensson H., Brattsten I. (1949). Arkiv. Kemi, **1**, 401—409.
Svensson H. (1961). Acta Chem. Scand., **15**, 325—341.
Svensson H. (1962a). Acta Chem. Scand., **16**, 456—466.
Svensson H. (1962b). Arch. Biochem. Biophys. Suppl., **1**, 132—140.
Svensson H. (1966). J. Chromatogr., **25**, 266—273.
Svensson H. (1967). Prot. Biol. Fluids, **15**, 515—522.
Swanson M. J., Sanders B. E. (1975). Anal. Biochem., **67**, 520—524.
Switzer III R. C., Merril C. R., Shifrin S. (1979). Anal. Biochem., **98**, 231—237.
Taketa F., Huang Y. P., Libnoch J. A., Dessel B. H. (1975). Biochim. Biophys. Acta, **400**, 348—353.
Talbot D. N., Yaphantis D. A. (1971). Anal. Biochem., **44**, 246—254.
Talbot P. (1975a). In: Isoelectric Focusing; Arbuthnott J. P. and Beeley J. A., eds. (Butterworths, London), pp. 270—274.
Talbot P., Caie I. S. (1975b). In: Isoelectric Focusing; Arbuthnott J. P. and Beeley J. A., eds. (Butterworths, London), pp. 74—77.
Tanaka T. (1981). Sci. American, **244**, 124—138.

Tanford C. (1962). Adv. Protein Chem., **17**, 69—95.
Tanford C., Reynolds J. A. (1976). Biochim. Biophys. Acta, **457**, 171—212.
Tariverdian G., Ritter H., Wendt G. G. (1970). Hum. Genet., **11**, 75—77.
Taylor J., Anderson N. L., Coulter B. P., Scandora E. A. Jr., Anderson N. G. (1980). In: Electrophoresis '79; Radola B. J., ed. (de Gruyter, Berlin), pp. 329—339.
Taylor J., Anderson N. L., Anderson N. G. (1981). In: Electrophoresis '81; Allen R. C. and Arnaud P., eds. (de Gruyter, Berlin), pp. 383—400.
Theorell H., Akesson A. (1941). J. Amer. Chem. Soc., **63**, 1804—1808.
Thillet J., Blouquit Y., Perrone F., Rosa J. (1977). Biochim. Biophys. Acta, **491**, 16—22.
Thorsrud A. K., Haugen H. F., Jellum E. (1980). In: Electrophoresis'79; Radola B. J., ed. (de Gruyter, Berlin), pp. 425—436.
Thorstensson A., Sjodin B., Karlsson J. (1975). In: Progress in Isoelectric Focusing and Isotachophoresis; Righetti P. G., ed. (Elsevier, Amsterdam), pp. 213—222.
Thymann M. (1980). In: Electrophoresis'79; Radola B. J., ed. (de Gruyter, Berlin), pp. 123—128.
Tiselius A. (1941). Svensk Kem. Tidskr., **58**, 305—310.
Tolkacho N. V. (1974). Urk. Biokhim., **46**, 441—445.
Tollaksen S. L., Anderson N. G. (1980). In: Electrophoresis'79; Radola B. J., ed. (de Gruyter, Berlin), pp. 405—414.
Tollaksen S. L., Edwards J. J., Anderson N. G. (1981). Electrophoresis, **2**, 155—160.
Tombs M. P. (1965). Anal. Biochem., **13**, 121—132.
Troitzki G. V., Saviolov V. P., Kirjukhin I. F., Abramov V. M., Agitsky G. Y., **214**, 955—958.
Троицкий Г. В., Кирюхин И. Ф., Толкачева Н. В., Агицкий Г. (1974б). Вопр. мед. химии, **20**, 24—31.
Troitzki G. V., Savialov V. P., Kirjukhin I. F., Abramov V. M., Agitsky G. (1975). Biochim. Biophys. Acta, **400**, 24—31.
Tuszynski G. P., Buck C. A., Warren L. (1979). Anal. Biochem., **93**, 329—338.
Tuttle A. M. (1956). J. Lab. Clin. Med., **47**, 811—816.
Ui N. (1971). Biochim. Biophys. Acta, **229**, 567—581.
Urushizaki I., Niitsu Y., Ishitani K., Matsuda M., Fukuda M. (1971). Biochim. Biophys. Acta, **249**, 187—192.
Valentini L., Gianazza E., Righetti P. G. (1980). J. Biochem. Biophys. Methods, **3**, 323—338.
Valkonen K., Gianazza E., Righetti P. G. (1980). Clin. Chim. Acta, **107**, 223—229.
Valmet E. (1969). Aci. Tools, **16**, 8—13.
Valmet E. (1970). Prot. Biol. Fluids, **17**, 401—407.
Van Orden D. E. (1971). Immunochemistry **8**, 869—875.
Vesterberg O., Svensson H. (1966a). Acta Chem. Scand., **20**, 820—834.
Vesterberg O., Berggren B. (1966b). Arkiv Kemi, **27**, 119—125.
Vesterberg O., Wadström T., Vesterberg K., Svensson H., Malmren B. (1967). Biochem. Biophys. Acta, **133**, 435—445.
Vesterberg O. (1968). Svensk Kem. Tidskr., **80**, 213—225.
Vesterberg O. (1969a). Acta Chem. Scand., **23**, 2653—2666.
Vesterberg O. (1969b). Sci. Tools, **16**, 24—27.
Vesterberg O. (1970a). In: Methods in Microbiology; Norris J. R., Ribbons D. W., eds. Vol. 53 (Academic Press, New York), pp. 595—614.
Vesterberg O. (1970b). Prot. Biol. Fluids, **17**, 383—387.
Vesterberg O. (1971a). In: Methods in Enzymology; Jakoby W. B., ed. (Academic Press, New York) Vol. 22, pp. 389—412.
Vesterberg O. (1971b). Biochim. Biophys. Acta, **243**, 345—348.

Vesterberg O. (1972). Biochim. Biophys, Acta, **257**, 11—19.
Vesterberg O., Eriksson R. (1972). Biochim. Biophys. Acta, **285**, 393—397.
Vesterberg O. (1973a). In: VII Symposium on Chromatography and Electrophoresis (Publ. Press Acad. Europeennes, Brussels), pp. 81—98.
Vesterberg O. (1973b). Sci. Tools, **20**, 22—29.
Vesterberg O. (1973c). Ann. N. Y. Acad. Sci., **209**, 23—33.
Vesterberg O. (1973d). Acta Chem. Scand., **27**, 2415—2420.
Vesterberg O. (1975). In: Isoelectric Focusing; Arbuthnott J. P., Beeley J. A., eds. (Butterworths, London), pp. 78—98.
Vesterberg O. (1976). In: Isoelectric Focusing; Catsimpoolas N., ed. (Academic Press, New York), pp. 53—76.
Vesterberg O., Hansén L. (1977). In: Electrofocusing and Isotachophoresis; Radola B. J., Graesslin D., eds. (de Gruyter, Berlin), pp. 123—133.
Vesterberg O. (1978). Int. Lab. May—June, 61—68.
Vesterberg O., Hansén L. (1978). Biochim. Biophys. Acta, **534**, 369—373.
Vesterberg O. (1980). In: Electrophoresis'79; Radola B. J., ed. (de Gruyter, Berlin), pp. 95—104.
Vincent R. K., Hartman J., Barret A. S., Sammons D. W. (1981). In: Electrophoresis'81; Allen R. C., Arnaud P., eds. (de Gruyter, Berlin), pp. 371—381.
Vinogradov S. N., Lowenkron S., Andonian H. R., Bagshaw J., Felgenhauer K., Pak S. J. (1973). Biochem. Biophys. Res. Commun., **54**, 501—506.
Von Klobusitzky D., König P. (1973). Arch. Exp. Pathol. Pharmakol., **192**, 271—275.
Wadström (1967). Biochim. Biophys. Acta, **147**, 441—448.
Wadström J., Hisatsune K. (1970a). Biochem. J., **120**, 725—734.
Wadström J., Hisatsune K. (1970b). Biochem. J., **120**, 735—744.
Wadström T., Smyth C. (1973). Sci. Tools, **20**, 17—21.
Wadström T., Mollby R., Jeansson S., Wretlind B. (1974). Sci. Tools, **21**, 2—4.
Wadström T., Smyth C. (1975a). In: Isoelectric Focusing; Arbuthnott J. P., Beeley J. A., eds. (Butterworths, London), pp. 152—177.
Wadström T., Smyth C. (1975b). In: Progress in Isoelectric Focusing and Isotachophoresis; Righetti P. G., ed. (Elsevier, Amsterdam), pp. 149—163.
Wadström T. (1975c). In: Progress in Isoelectric Focusing and Isotachophoresis; Righetti P. G., ed. (Elsevier, Amsterdam), pp. 389.
Wagner H., Speer W. (1978). J. Chromatogr., **157**, 259—265.
Wagstaff M., Worwood M., Jacobs A. (1978). Biochem. J., **173**, 969—977.
Wajcman H., Kilmartin J. V., Najman A., Labie D. (1975). Biochim. Biophys. Acta, **400**, 354—364.
Wajcman H., Krishnamoorthy R., Gacon G., Elion J., Allard C., Labie D. (1976). J. Mol. Med., **1**, 187—197.
Wallevik K. (1973). Biochim. Biophys. Acta, **322**, 75—87.
Walton K. E., Styer D., Gruenstein E. (1979). J. Biol. Chem., **254**, 795—800.
Walther F., Schubert J. C. F. (1974). Blut, **28**, 211—215.
Wardi A. H., Michos G. A. (1972). Anal. Biochem., **49**, 607—613.
Weatherall D. J., Pembrey M. E., Pritchard J. (1974). Clin. Haematol., **3**, 467—472.
Weatherall D. J., Clegg J. B. (1981). The Thalassemia Syndromes, 3rd Edn., Blackwell Scientific, Oxford.
Weller D. L., Heaney A., Sjogren R. E. (1968). Biochim. Biophys. Acta, **168**, 386—388.
Whalen R. G., Butler-Browne G. S., Gross F. (1976). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **73**, 2018—2022.
Whitney III, J. B., Copland G. T., Skovand L. C., Russel E. S. (1979). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76**, 867—871.

Willard K. E., Giometti C. S., Anderson N. L., O'Connor J. E., Anderson N. G. (1979). Anal. Biochem., **100**, 289—298.
Willard K. E., Anderson N. L. (1980). In: Electrophoresis '79; Radola B. J., ed. (de Gruyter, Berlin), pp. 415—424.
Williams K. W., Söderberg L. (1979). Int. Lab. Jan/Febr., 45—53.
Williams R. J. (1935). J. Biol. Chem., **110**, 589—596.
Williams R. R., Waterman R. E. (1929). Proc. Exp. Biol. Med., **27**, 56—61.
Williams R. R., Truesdail J. M. (1931). J. Am. Chem. Soc., **53**, 4171—4174.
Williamson A. R. (1971). Eur. J. Immunol., **1**, 390—394.
Williamson A. R. (1973). In: Handbook of Experimental Immunology; Weir D. M., ed. (Blackwell, Oxford), Ch. 8, pp. 1—23.
Williamson A. R., Salaman M. R., Kreth N. H. (1973). Ann. N. Y. Acad. Sci., **209**, 210—224.
Wilson C. M. (1973). Anal. Biochem., **53**, 538—545.
Winters A., Perlmutter M., Davies M. (1975). LKB Application Note No. 198.
Winter A., Karlsson C. (1976). LKB Application Note No. 219.
Winters A. (1977). In: Electrofocusing and Isotachophoresis; Radola B. J., Graesslin D., eds. (de Gruyter, Berlin), pp. 433—442.
Worwood M., Wagstaff M., Jones B. M., Dawkins S., Jacobs A. (1977). In: Proteins of Iron Transport and Storage in Biochemistry and Medicine; Aisen P., Brown E., eds. (Green and Stratton, New York), pp. 79—91.
Wrigley C. (1968a). Sci. Tools, **15**, 17—23.
Wrigley C. (1968b). J. Chromatogr., **36**, 362—365.
Wrigley C. W. (1970). Biochem. Genet., **4**, 509—515.
Wrigley C., Stepherd K. W. (1973). Ann. N. Y. Acad. Sci., **209**, 154—162.
Wrigley C. W. (1977). In: Biological and Biomedical Applications of Isoelectric Focusing; Catsimpoolas N., Drysdale J. W., eds. (Plenum Press, New York), pp. 211—264.
Yeoman L. C., Taylor C. W., Busch H. (1974). Cancer Res., **34**, 424—428.
Young C. W., Bittar E. S. (1973). Cancer Res., **33**, 2692—2700.
Young J. L., Webb B. A. (1978a). Anal. Biochem., **88**, 619—623.
Young J. L., Webb B. A. (1978b). Sci. Tools, **25**, 54—56.
Young J. L., Webb B. A., Coutie D. G., Reid B. (1978). Biochem. Soc. Trans., **6**, 1051—1054.
Young J. L., Webb B. A. (1980). Prot. Biol. Fluids, **27**, 739—742.
Yu S. M., Spring T. G. (1978). Anal. Biochem., **85**, 287—290.
Zacharius R. M., Zell T. E. (1969). Anal. Biochem., **30**, 148—155.
Zannis V. I., Breslow T. L. (1980). In: Electrophoresis '79; Radola B. J., ed. (de Gruyter, Berlin), pp. 437—443.
Zech R., Zürcher K. (1973). Life Sci., **13**, 383—389.
Zech R., Zürcher K. (1974). Arzneim. Forsch., **24**, 337—340.
Zechel K. (1977). Anal. Biochem., **83**, 240—251.
Zeineh R. A., Nijm W. P., Al-Azzawi F. M. (1975). Am. Lab., **1**, 51—58.
Ziabicki A. (1979). Polymer, **20**, 1373—1381.
Ziegler A., Köhler G. (1976). FEBS Lett., **64**, 48—51.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

Агарозный гель 18, 22, 164—166
Акриламид 56, 97
Акриловая кислота 45, 52, 55, 59, 60, 96
β-Аланин 296
Альбумин 59, 124
Алюмогидрид лития 165
Амилаза 129
м-Аминобензойная кислота 94
5-аминовалериановая кислота 296
7-аминокаприловая кислота 296
6-аминокапроновая кислота 297
β-Аминокислоты 45
4-аминомасляная кислота 296
Аммонийный буфер 192
Амфолиты-носители 18, 31, 38, 42, 44, 49, 51, 52, 55, 59, 61, 68
α_1-Антитрипсин 48, 56, 238
Аргинин 47, 75, 104
Аспарагиновая кислота 43, 47, 90, 93, 94, 104
Ацетатный буфер 192
Ацетилцеллюлоза 182

Бактопептон 86
Биогель *Р* 73, 141
Биолиты 49
Бисоксирановый мостик 155
Бора эффект 352
Бромфеноловый синий 217
Буферная емкость 29, 30, 32, 43, 59, 76, 96

Вазопрессин 14
Винилимидазол 96
Винилсульфонат 48
Витамин B_{12} и связывающие его белки 90
Вместимость по числу пиков 35

D-галактоза-4-6-(1-карбоксиэтилиден) 165
L-галактозо-6-сульфат 165
Гексаметилентетрамин 52
Гемоглобин 42, 216, 347—363
Гемоглобин — CO (HbCO) 216
Гемоцианин моллюска 177
Гепарин 129, 322
Гидродинамический радиус 24
Гидроксид кальция 191
Гипофиза экстракт 120
Гистидин 32, 42, 86, 95, 104, 297
Глицерин 29, 88, 100, 187
Глицин 32, 95
Глутамат натрия 13
Глутаминовая кислота 32, 43, 47, 90, 104
Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа 121, 244
Градиент плотности раствора сахарозы 15, 21, 24, 98

Дансилхлорид 220
Декстран 100
Декстрансульфат 129
Детергенты 187, 286—291
3,3′-диаминобензидин 227
1,4-диаминобутан
1,6-диаминогексан 46
1,5-диаминопентан 46
2,3-димеркаптопропанол 287
3-диметиламинопропилметакриламид 314
Диметилсульфат 49
Диметилсульфоксид (ДМСО) 85, 216, 291, 292
Диметилформамид (ДМФ) 85, 292
Диоксан 88, 165
Дитиотрейтол, дитиоэритритол 287
1,2,7,8-диэпоксиоктан 56
Диэтилентриамин 45
Длина пути при ИЭФ 35
Додецилсульфат натрия (ДДС-Na, ДСН) 24, 73

Загрузка белковой зоны 36
Зонально-конвекционное ИЭФ 104

Изоперихорическое фокусирование 22
Изопикническое центрифугирование 24
Изопротонное состояние 29
Иммуноглобулины *М* 177
Итаконовая кислота 45, 55

Казеин 42
Керосин 199
Конканавалин А 240
Коэффициент диффузии 28
— преломления 16, 61, 62
Кристаллины глазного хрусталика 121
Кротоновая кислота 45
Кумасси фиолетовый R-150 64, 142, 174
— ярко-синий (CBB) G-250 184, 219
— — — R-250 181, 184, 218

α-Лактальбумин 124
β-Лактоглобулин 124
Лизин 32, 47, 75, 104
Лизосомы 129
Лимонная кислота 104
Лимфоциты 129

Малеиновая кислота 45
Малоновая кислота 47
Маннитол 100
α_2-Макроглобулин 177
Меди сульфат 219
2-меркаптоэтанол 181, 183, 296
Метакриламидопропилтриметиламмонийхлорид (МАПТАХ) 314
Метакриловая кислота 45
Метакрилоксипропилтриметоксисилан 205
Метилакрилат 58
[^{14}C]-метил-D-глюкозид 240

N,N′-метиленбисакриламид (бис) 56, 167, 187

О-метилизомочевина 155
2-метокси-2,4-дифенил-3(2Н)-фуранон (МДФФ) 220
Миелин 73
Микро-ИЭФ 213
Миоглобин 117, 157
Митохондрии 129
Михаэля реакция 45
Многокамерные электролизеры 124
Многофазные колонки 146
Молекулярно-ситовые явления 167—175
Мочевина 181

Напряженность поля 35
Нингидрин 65
n-Нитрофенилоксамовая кислота 309
Нонидет NP-40 73, 79, 286

Овальбумин 117
Окситоцин 14
Октилглюкозид 289

Парафиновое масло 199
Певикон С-870 67, 146
Пентаэтиленгексамин (ПЭГА) 45, 46, 48, 52, 54, 57, 64, 75
Пепсин 90, 157
Персульфат 167, 187
Пикриновая кислота 64, 65
Полиакриламидный гель (ПААГ) 18, 22, 37, 166—176
Полиаминополикарбоновые кислоты 44
Полианетолсульфоновая кислота 129
Полибуфер 154
Полибуферные обменники (PBE) 154, 155
Поливинилацетат 67
Поливинилсульфат 129
Поливинилхлорид 67, 200
Полигликаны 100
Полиэтиленимин (ПЭИ) 48, 60, 155
Пролин 296
Проназа Е 142
Пропансультон 48
Пропилендиамин 48

Разрешающая способность 33
Рентгеновская пленка (Kodirex) 232
Рибозофосфатизомераза 121
Рибофлавин 187, 189

Салицилат натрия 234
Сахароза 29, 96
Светло-зеленый (Light Green) SF 142, 184, 217
Свободные радикалы 190
Сервалиты 48, 49, 65, 68, 76
Серебра нитрат 223
Серная кислота 103, 184, 219
Сефадекс 18, 67, 80, 141, 143, 145, 154
Сефароза 6В 155
Силиконовая резина 208
Сорбитол 29, 100, 181, 187
Стафилококковый α-токсин 157
Сукцинилированный альбумин 57
Сульфобетаины 287
Сульфосалициловая кислота 85, 218

Таурин 288
Твин-80 79, 286
Тетраглицин 296
Тетраметилмочевина (ТММ) 85, 292
N,N,N′,N′-тетраметилэтилендиамин (ТЕМЭД) 118, 167, 187
Тетраэтиленпентамин (ТЭПА) 45, 46, 52, 54, 64
Тиодигликолевая кислота 309
Тироксинсвязывающий белок 240
Трансферрин 239
Трехфтористый бор (BF_3) 182
Триметиламинопропансульфокислота 342
Трис 104
Тритон X-100 286
Трихлоруксусная кислота (ТХУ) 72, 85, 217—219
Триэтилентетрамин (ТЭТА) 45, 46, 52, 54, 64
Тяжелая вода (D_2O) 101

Фармалиты 49, 68, 76
Фенил-сефароза 209
Ферритин 241, 342—347
Феррицианид калия 162
Флуорескамин 220
Формамид 85, 279
Фосфорилфосфатаза 121
Фосфорная кислота 103, 118, 191
Фреон 121

Хлоральгидрат 85
Хлорная кислота 219
Хлорометилфосфонат 48
Хондроитинсульфат 129

[^{14}C]-цнанокобаламнн 240
Цинк-глицинатный опухолевый маркер 177
Цитохром *c* 89

Электропроводность 31, 39, 41, 59, **76**, 96
Электрофоретическая подвижность **28**, 73
Электроэндосмос 130, 313
Эмазол 286
Эпихлоргидрин 49, 50
2,3-эпоксипропанол-1 56
Этанол 88, 217
Этаноламин 103, 128
Этиленгликоль 100
Этилендиамин 45, 103, 184
Этиленимин 48

Cytophaga jonsonii 157
Drimarene Brilliant Blue K-BL 221
Kodak Photo-Flow 196, 203
Poly-Prep 200 111

ОГЛАВЛЕНИЕ

От переводчика 5

Предисловие 8

Список сокращений и условных обозначений 13

Глава 1. Теория и важнейшие аспекты изоэлектрофокусирования . . 14

1.1. История метода 14
1.2. Принцип ИЭФ 18
1.3. Обобщение принципа ИЭФ 22
1.4. Книги и обзоры, посвященные ИЭФ 24
1.5. Теория и важнейшие аспекты ИЭФ 26
1.5.1. Искусственный градиент pH 27
1.5.2. Естественный (равновесный) градиент pH 27
1.5.3. Общее дифференциальное уравнение ИЭФ 28
1.5.4. Буферная емкость в изопротонном состоянии 29
1.5.5. Электропроводность в изопротонном состоянии 31
1.5.6. Принцип монотонного изменения pH 32
1.5.7. Разрешающая способность 33
1.5.8. Вместимость по числу пиков 35
1.5.9. Предельная загрузка белковой зоны 36
1.5.10. Условия образования плавного градиента pH 38
1.6. Синтез амфолитов торговых марок 42
1.6.1. Синтез амфолинов (фирма LKB) 44
1.6.2. Синтез сервалитов (фирма Serva) 48
1.6.3. Синтез фармалитов (фирма Pharmacia) 49
1.7. Лабораторный синтез амфолитов-носителей 51
1.7.1. Метод Виноградова — Ригетти 52
1.7.2. Метод Шарлионе и др. 55
1.7.3. Метод Джаста 57
1.7.4. Высокомолекулярные амфолиты Ригетти — Хьертена . . 59
1.8. Методы детектирования амфолитов-носителей 61
1.9. Фракционирование амфолитов-носителей 65
1.10. Основные свойства амфолитов-носителей 68
1.10.1. Молярность и ионная сила амфолитов-носителей . . . 68
1.10.2. Изоэлектрическая и изоионная (изопротонная) точки . . 71
1.10.3. Молекулярная масса 72
1.10.4. Оптические свойства 75
1.10.5. Буферная емкость и электропроводность амфолинов, сервалитов и фармалитов 76
1.10.6. Распределение амфолитов-носителей при фокусировании. Общее число индивидуальных компонентов 79
1.10.7. Хелатирующие свойства 81
1.10.8. Биологическая токсичность 83
1.10.9. Растворимость амфолитов-носителей в различных растворителях 84
1.10.10. Регенерация амфолитов-носителей 85
1.11. Альтернативные способы формирования градиента pH . . . 86

1.11.1. Амфолиты-носители на основе бактопептона 86
1.11.2. Тепловой градиент pH 86
1.11.3. Градиенты pH, возникающие при изменении диэлектрической проницаемости среды и на границе раздела фаз 88
1.11.4. Градиенты pH, образуемые вследствие диффузии буферов 89
1.11.5. Градиенты pH, образуемые смесями кислот, оснований и амфолитов 90
1.11.6. Градиент pH, образованный двумя-тремя амфолитами; моделирование при помощи ЭВМ 92
1.11.7. Иммобилизованные градиенты pH 95

Глава 2. Препаративное изоэлектрофокусирование 97

2.1. Препаративное ИЭФ в жидкой среде 98
2.1.1. Колонки фирмы LKB 98
2.1.2. Колонки фирмы ISCO 109
2.1.3. Система Poly-Prep 200 111
2.1.4. Колонки Свенссона (Рильбе) 113
2.1.5. Зонально-конвекционное ИЭФ по Вальмету 115
2.1.6. Зонально-конвекционное ИЭФ по Тальботу 117
2.1.7. Зонально-конвекционное ИЭФ по Денкла 118
2.1.8. Зонально-конвекционное ИЭФ в сплошной спирали . . . 120
2.1.9. Зонально-конвекционное ИЭФ в «открытой» спирали . . 121
2.1.10. Жидкостное ИЭФ во вращающихся трубках по Хьертену 123
2.1.11. Многокамерные электролизеры 124
2.1.12. Высоковольтное ИЭФ в свободном потоке по Ханнигу . . 126
2.1.13. Высоковольтное ИЭФ в свободном потоке по Джасту и Вернеру 127
2.1.14. Высоковольтное ИЭФ в свободном потоке по Прусику . . 129
2.1.15. Циклическое ИЭФ в непрерывном потоке 130
2.1.16. Проточное ИЭФ в градиенте плотности 131
2.1.17. Стационарный реоэлектролиз 134
2.2. Препаративное ИЭФ в гелях 137
2.2.1. Проточное ИЭФ по Фоусетту 137
2.2.2. Проточная разделительная камера Квормби 138
2.2.3. ИЭФ в гранулированных гелях (не проточное) 141
2.2.4. ИЭФ в многофазных колонках 146
2.2.5. ИЭФ в цилиндрических полиакриламидных гелях . . . 148
2.2.6. ИЭФ в пластинах полиакриламидного и агарозного гелей 150
2.2.7. Хроматофокусирование и амфолит-вытеснительная хроматография 151
2.2.8. Заключительные замечания. О максимальной загрузке образцом 156

Глава 3. Аналитическое изоэлектрофокусирование 159

3.1. ИЭФ в градиенте плотности с использованием небольших колонок 160
3.2. Аналитическое ИЭФ в гелях 163
3.2.1. Строение агарозной матрицы 164
3.2.2. Структура и свойства полиакриламидных гелей 166
3.2.3. Высокосшитые гели. Применение различных типов сшивающих агентов 173
3.2.4. ИЭФ в тонких агарозных пластинах 176
3.2.5. ИЭФ на ацетилцеллюлозных пленках 182
3.2.6. ИЭФ в тонком слое гранулированного геля 183
3.2.7. ИЭФ в полиакриламидных гелях 184
3.2.8. Состав геля 185
3.2.9. Полимеризация геля 187
3.2.10. Выбор электродных растворов 190

3.2.11. ИЭФ в пластинах ПААГ 192
3.2.12. Готовые пластины геля 201
3.2.13. ИЭФ в ультратонких полиакриламидных гелях 202
3.2.14. Внесение образца при ИЭФ в плоских и цилиндрических гелях 207
3.2.15. Высушивание гелей 210
3.2.16. ИЭФ в цилиндрических гелях 211
3.2.17. Микро-ИЭФ 213
3.2.18. ИЭФ при минусовых температурах 215
3.3. Методы детектирования белков в гелях 217
3.3.1. Способы окрашивания 217
3.3.2. Окрашивание серебром 221
3.3.3. Денситометрирование сфокусированных зон 226
3.3.4. Радиоавтография и флюорография 230
3.3.5. Иммунологические методы 237
3.3.6. Специфические методы окраски и метод зимограмм . . . 239
3.4. Методы двумерного фракционирования 248
3.4.1. ИЭФ—иммуноэлектрофорез (или иммунофиксация) . . . 250
3.4.2. ИЭФ—обычный электрофорез в геле 254
3.4.3. ИЭФ—электрофорез в градиентном геле 255
3.4.4. Изоэлектрофокусирование — изотахофорез (ИЭФ — ИТФ) 256
3.4.5. ИЭФ в «поперечном» градиенте концентрации мочевины . . 256
3.4.6. ИЭФ—электрофорез в ДДС-Na 258
3.5. Предстационарное ИЭФ (TRANSIEF) 267
3.6. Обнаружение мутаций, приводящих к замене одной нейтральной аминокислоты на другую 269
3.7. Кривые титрования 273

Глава 4. Общие экспериментальные аспекты 281
4.1. Изоэлектрическая преципитация 281
4.2. Некоторые «добавки» при ИЭФ 286
4.3. Внесение образца 292
4.4. Выбор градиента pH. Получение узких градиентов pH . . 296
4.5. Измерение градиента pH 301
4.6. Удаление амфолитов-носителей после ИЭФ 307
4.7. Возможные модификации белков в ходе ИЭФ 309
4.8. Источники питания 311
4.9. Катодный дрейф 312
4.10. Неполадки и их устранение 316
4.11. Артефакты. Общий анализ 319

Глава 5. Некоторые применения метода ИЭФ 328
5.1. ИЭФ пептидов 328
5.2. ИЭФ клеток, субклеточных частиц, бактерий и вирусов . . . 335
5.3. ИЭФ ферритинов 342
5.4. ИЭФ гемоглобинов 347
5.5. Иммобилины с этим справятся! 363

Литература 369

Предметный указатель 393

УВАЖАЕМЫЙ ЧИТАТЕЛЬ!

Ваши замечания о содержании книги, ее оформлении, качестве перевода и другие просим присылать по адресу:

129820, Москва, И-110, ГСП, 1-й Рижский пер., д. 2, издательство «Мир».

П. Ригетти

ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЕ ФОКУСИРОВАНИЕ
ТЕОРИЯ, МЕТОДЫ И ПРИМЕНЕНИЕ

Научный редактор Н. Н. Шафрановская. Мл. редактор М. Р. Погосбекова.
Художник Ю. И. Артюхов. Художественный редактор А. Я. Мусин.
Технический редактор В. П. Сизова. Корректор В. И. Постнова

ИБ № 5459

Сдано в набор 25.11.85. Подписано к печати 4.04.86.
Формат 60×90 1/16. Бумага кн. журн. имп.
Печать высокая. Гарнитура литературная.
Объем 12,50 бум. л. Усл. печ. л. 25,00.
Усл. кр.-отт. 25,00. Уч.-изд. л. 26,64. Изд. № 4/3912.
Тираж 2 250 экз. Зак. 1488. Цена 4 р. 30 к.

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР».
129820, ГСП, Москва, И-110, 1-й Рижский пер., 2.

Московская типография № 11 Союзполиграфпрома при Государственном комитете СССР
по делам издательств, полиграфии и книжной торговли.
113105, Москва, Нагатинская ул., д. 1.